



Nuevas Estrategias Para Incrementar la Eficacia de la Terapia Fotodinámica

New Strategies to Enhance the Efficacy of Photodynamic Therapy

TESIS DOCTORAL

Pilar Acedo Núñez

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, Febrero de 2014

Memoria presentada por **Pilar Acedo Núñez**

para optar al grado de Doctor

por la Universidad Autónoma de Madrid.

Proyecto de Tesis Doctoral dirigido por la

Dra. Ángeles Villanueva Oroquieta

Departamento de Biología

de la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, Febrero de 2014

La presente Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la
financiación otorgada por las siguientes Instituciones:

- MEC (CTQ2007-67763-C03-02/BQU)

Evaluación de la eficacia de fotosensibilizadores de nueva síntesis
para inactivar células tumorales en cultivo:
influencia de su vehiculización e identificación
de los mecanismos de muerte celular.

- MEC (CTQ2010-20870-C03-03/BQU)

Nuevas estrategias para Terapia Fotodinámica dirigida.



Carpe Diem

Abreviaturas	1
Resumen	3
<i>Abstract</i>	4
Introducción	5
<i>Brief Introduction</i>	7
Terapia Fotodinámica (TFD)	9
Fundamentos y aplicaciones de la TFD.....	9
Mecanismos de acción de la TFD	11
Fotosensibilizadores (FSs)	12
Regresión tumoral inducida por TFD	16
Mecanismos de muerte celular	17
TFD y muerte celular <i>in vitro</i>	26
Nuevas estrategias terapéuticas en TFD	28
Combinación de la TFD con otras terapias antitumorales.....	29
Nuevos sistemas de transporte de los FSs para TFD	34
Cultivos celulares en tres dimensiones (3D).....	38
Hipótesis y Objetivos	43
<i>Hypothesis and Objectives</i>	46
Materiales y Métodos	47
Cultivos celulares.....	49
Fotosensibilizadores	51
Nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNPs).....	53
Tratamientos fotodinámicos	54
Ensayos de viabilidad	57
Análisis de las alteraciones en la morfología celular	60
Caracterización de los mecanismos de muerte celular inducidos.....	62
Análisis del citoesqueleto y de proteínas de adhesión celular	67
Análisis de la migración celular mediante el ensayo de cierre de herida	69
Cuantificación de la internalización de diferentes compuestos.....	69
Localización subcelular de los FSs	70
Análisis de la respuesta a la tripsina.....	71
Detección de las ROS generadas por el tratamiento fotodinámico sinérgico	72
Evaluación de la estabilidad lisosomal	72
Videomicroscopía	72

Detección de la localización de la ZnPc y el TMPyP en ratones portadores de tumores	73
Farmacocinética de la ZnPc y el TMPyP en ratones portadores de tumores	73
Análisis de la respuesta a los tratamientos de TFD en ratones C57BL/6.....	74
Microscopía óptica	74
Estadística.....	74
Resultados	77
1. Ensayos realizados <i>in vitro</i> en cultivos celulares (2D)	79
1. A. Caracterización fotobiológica del porfíriceno Py3MeO-TBPO	79
1. B. Evaluación del efecto inducido por la combinación de ZnPc + TMPyP	89
1. C. Efecto de la vehiculización del TMPyP en NPs mesoporosas de sílice	109
2. Ensayos realizados en células B78H1 y en ratones C57BL/6	121
2.A. Evaluación del efecto inducido por ZnPc + TMPyP en células B78H1	121
2.B. Evaluación del efecto inducido la TFD combinada <i>in vivo</i>	125
3. Ensayos realizados en cultivos celulares 3D	137
3.A. Cultivos celulares 3D en Matrigel™	137
3.B. Cultivos celulares 3D en matrices de colágeno 1 y del péptido RAD16-I	139
Discusión	147
<i>Brief Discussion</i>	149
El porfíriceno Py ₃ MeO-TBPO: un buen agente para TFD	151
Las MSNPs como vehículos idóneos para la incorporación de FSs.....	156
La combinación de dos FSs: una nueva estrategia que incrementa la eficacia de la TFD	159
A. Efecto sinérgico de la combinación de ZnPc y TMPyP en cultivos celulares 2D.....	160
B. Ensayos <i>in vivo</i>	168
C. Los cultivos celulares 3D: una herramienta imprescindible en TFD	172
Conclusiones	177
<i>Conclusions</i>	180
Bibliografía	183
Publicaciones	203

¹O₂	Oxígeno singlete / <i>Singlet oxygen</i>
ADN / DNA	Ácido desoxirribonucleico / <i>Deoxyribonucleic acid</i>
ALA	Ácido 5-aminolevulínico / <i>5-Aminolevulinic Acid</i>
AO	Naranja de acridina / <i>Acridine Orange</i>
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2 / <i>Bcl-2 Associated X Protein</i>
BPD-MA	Derivado monoácido de la benzoporfirina / <i>Benzoporphyrin derivative monoacid ring A</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol / <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DiOC₆(3)	3,3'-dihexil-oxocarbocianina / <i>3,3'-Dihexyloxacarbocyanine Iodide</i>
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco / <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido / <i>Dimethyl sulfoxide</i>
DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina / <i>Dipalmitoylphosphatidylcholine</i>
FAK	Quinasa de adhesión focal / <i>Focal adhesion kinase</i>
FS / PS	Fotosensibilizador / <i>Photosensitizer</i>
GM130	Golgina 130 / <i>Golgi matrix protein GM130</i>
H-33258	<i>Hoechst 33258</i>
H-E	Hematoxilina-Eosina / <i>Hematoxylin-Eosin</i>
IP / PI	Ioduro de Propidio / <i>Propidium Iodide</i>
i.v.	Inyección intravenosa / <i>Intravenous injection</i>
LED	Diodo emisor de luz / <i>Light Emitting Diode</i>
LTG	<i>LysoTracker® Green DND-26</i>
MEC / ECM	Matriz extracelular / <i>Extracellular Matrix</i>
MFs	Microfilamentos de actina-F / <i>F-actin microfilaments</i>
MSNPs	Nanopartículas mesoporas de sílice / <i>Mesoporous silica nanoparticles</i>
MTG	MitoTracker® Green FM

Abreviaturas

MTs	Microtúbulos / <i>Microtubules</i>
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil-tetrazolio / <i>3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide</i>
NPs	Nanopartículas / <i>Nanoparticles</i>
PARP	poli-(ADP-ribosa) polimerasa / <i>poly-(ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	Tampón fosfato salino / <i>Phosphate Buffered Saline</i>
Py ₃ MeO-TBPO	2,7,12-tris(α-piridinio-p-tolil)-17-(p-metoximetil)fenil porficeno <i>2,7,12-tris(α-pyridinio-p-tolyl)-17-(p-(methoxymethyl)phenyl) porphycene</i>
RE	Retículo endoplasmático / <i>Endoplasmic reticulum</i>
RN / NR	Rojo Neutro / <i>Neutral Red</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno / <i>Reactive Oxygen Species</i>
SEM	Microscopía electrónica de barrido / <i>Scanning Electron Microscopy</i>
SFB / FBS	Suero fetal bovino / <i>Fetal Bovine Serum</i>
TEM	Microscopía electrónica de transmisión / <i>Transmission Electron Microscopy</i>
TFD / PDT	Terapia Fotodinámica / <i>Photodynamic Therapy</i>
TMPyP	meso-tetra(4-N-metilpiridil)porfina / <i>meso-tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphine</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling</i>
ZnPc	Ftalocianina de zinc(II) / <i>Zinc(II) phthalocyanine</i>
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial / <i>Mitochondrial membrane potential</i>

La terapia fotodinámica (TFD) es una modalidad terapéutica clínicamente aprobada para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por una proliferación celular incontrolada, principalmente el cáncer. Esta terapia induce una acción citotóxica selectiva hacia células tumorales mediante el efecto combinado de tres elementos: un fotosensibilizador (FS), luz y oxígeno. Las numerosas deficiencias que presentan las terapias aprobadas para el tratamiento del cáncer, incluida la TFD, han conducido al desarrollo de nuevas estrategias más específicas y eficaces. Centrándonos en la TFD, existen múltiples abordajes para intentar incrementar su eficacia, incluyendo: i) buscar FSs óptimos, ii) incrementar su especificidad de acumulación en las áreas tumorales, y iii) administrar dos FSs, con distinta diana terapéutica y distinto mecanismo de acción, de forma similar a los protocolos clínicos utilizados en quimioterapia.

Los estudios relacionados con la síntesis y la administración de nuevos FSs, resultan fundamentales para el desarrollo de esta terapia. Por ello, en el presente trabajo de investigación se han analizado las propiedades fotobiológicas del porfíriceno 2,7,12-tris(α -piridinio-p-tolil)-17-(p-metoximetil)fenil), a fin de evaluar su potencial como un nuevo agente para TFD. Los resultados obtenidos han indicado que, este compuesto cumple muchas de las características requeridas para ser considerado un buen FS, induciendo una masiva y eficiente muerte celular en células tumorales en cultivo, utilizando protocolos experimentales menores, en relación con otros FSs aprobados en TFD clínica.

El punto central de la presente Tesis Doctoral fue analizar los efectos inducidos por tratamientos fotodinámicos basados en la administración simultánea de dos FSs, el derivado metálico de Zinc(II) y la porfirina *meso*-tetra(4-N-metilpiridil)porfina (TMPyP). Los estudios se han centrado en diferentes líneas celulares establecidas (humanas y murinas), empleando cultivos celulares 2D y 3D, así como modelos murinos (ratones C57BL/6 portadores de un melanoma amelanótico). Después de los numerosos ensayos realizados, se detectó que el protocolo fotodinámico combinado inducía un efecto letal y sinérgico empleando parámetros (concentración de FS y dosis de luz) más bajos que los empleados habitualmente. Por otra parte, dicho tratamiento sin posterior irradiación, no inducía citotoxicidad. Asimismo, se ha comprobado que la fotoinactivación celular se producía mayoritariamente por apoptosis o necrosis, en función de la intensidad del tratamiento fotodinámico aplicado. Además, se detectaron alteraciones en el citoesqueleto y en diversas proteínas de adhesión.

Por otra parte, los estudios farmacocinéticos llevados a cabo *in vivo*, mostraron una acumulación muy selectiva de ambos FSs en el tejido tumoral. Además, el tratamiento de TFD combinado reveló una inhibición significativa del crecimiento del tumor en comparación con la monoterapia. Por lo tanto, este novedoso enfoque puede ser una herramienta muy útil en futuras aplicaciones clínicas de TFD, permitiendo incrementar la eficacia terapéutica de los distintos tratamientos.

Por otro lado, se ha analizado la eficacia de las nanopartículas mesopososas de sílice (MSNPs), como un posible sistema de administración de FSs. Los resultados obtenidos han demostrado, que bajo nuestras condiciones experimentales, las MSNPs incrementan la acción fotodinámica del TMPyP.

Por último, teniendo en cuenta que los ensayos preclínicos se desarrollan habitualmente utilizando sistemas de cultivos celulares bidimensionales (2D), que no logran reproducir con precisión la complejidad de los tejidos, hemos desarrollado diversos modelos celulares tridimensionales (3D), como una herramienta fundamental e imprescindible en los estudios de los nuevos protocolos de TFD. Los resultados han revelado que los modelos 3D actúan de puente entre los cultivos celulares 2D y los modelos experimentales *in vivo* ya que pueden imitar el patrón de expresión génica y los gradientes moleculares de estos sistemas.

En resumen los resultados presentados en la presente Tesis Doctoral indican que, el desarrollo de la TFD requiere múltiples abordajes que permitan: i) diseñar el FS, o la combinación de FSs, que ejerzan un mayor efecto fototóxico, ii) seleccionar los métodos de transporte más idóneos para los mismos, posiblemente nanoplateformas funcionalizadas, que permitan una acumulación selectiva en el tejido tumoral, para inducir los mínimos efectos secundarios y, iii) diseñar protocolos experimentales enfocados a una terapia oncológica personalizada (en función de las características genéticas del tumor a tratar), incluyendo su combinación con las terapias oncológicas habituales. Dichos protocolos deberán ser ensayados en cultivos 3D antes de evaluar su eficacia en modelos animales.

Photodynamic therapy (PDT) is a clinically approved therapeutic modality for the treatment of diseases characterized by uncontrolled cell proliferation, mainly cancer. This therapy induces a selective cytotoxic activity toward tumor cells by the combined effect of three components: a photosensitizer (PS), light and oxygen. The numerous deficiency and several disadvantages of approved oncologic therapeutic modalities, including PDT, have led to the development of more specific and effective strategies. Focusing on the PDT, there are multiple approaches in order to increase their efficacy, including: i) a search for ideal PSs, ii)) to enhance accumulation preferentially within tumor area, and iii) simultaneous administration of two photosensitizers with different therapeutic target and diverse mechanism of action, in a similar way to clinical chemotherapy protocols.

Studies related to the synthesis and administration of new PSs, are fundamental for the development of this therapy. Therefore, in this study we have analyzed the photobiological properties of 2,7,12-tris(α -pyridinio-p-tolyl)-17-(p-methoxymethyl)phenyl porphycene, in order to assess its potential as a new PDT agent. In summary, this compound is endowed with many of the properties required to be considered a good PS, inducing a massive and efficient cell death in tumor cells, in comparison to approved PSs for clinical use in PDT.

The focus of this PhD thesis was to analyze to evaluate in depth the efficacy of PDT-treatments based on the simultaneous administration of two PSs, the Zinc(II)-phthalocyanine and the cationic porphyrin *meso*-tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphine (TMPyP). The studies were carried out on different established cell lines (human and murine) using 2D and 3D cellular systems and murine models (C57BL/6 mice bearing an amelanotic melanoma). After numerous assays, it was observed that the combined photodynamic protocol induced a lethal and synergistic effect using parameters (PS concentration and light dose) lower than those commonly used. On the other hand, we did not observed any dark toxicity. Also, we detected changes from predominant apoptosis (without cell detachment) to predominant necrosis, depending on the intensity of the PDT treatment. Furthermore, alterations in cytoskeleton components and in different adhesion proteins were detected. Finally, pharmacokinetic studies carried out *in vivo*, showed a highly selective accumulation of both PSs in tumor area. Moreover, the combined PDT treatment revealed a significant tumor growth inhibition compared to monotherapy. Thus, this novel approach can be a very useful tool in future PDT clinical applications, thereby increasing the therapeutic efficacy of different treatments.

Moreover, we analyzed the efficacy of mesoporous silica nanoparticles (MSNPs), as a potential delivery system for PSs. The results obtained showed that, under our experimental conditions, MSNPs increase the photodynamic action of TMPyP.

Finally, considering that preclinical tests have traditionally been developed using two-dimensional cellular systems (2D), which are unable to accurately represent the complexity of tissues, we showed the development of different three-dimensional models (3D), as a fundamental and essential tool in studies for new drugs screening. The results revealed that the 3D models act as a bridge between 2D cell cultures and *in vivo* experimental models as they can mimic *in vivo* gene expression pattern and molecular gradients of these systems.

INTRODUCCIÓN

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano.”

Isaac Newton (1642-1727)



Photodynamic therapy (PDT) is a multi-step and successful clinically approved oncologic therapeutic modality, which involves the selective uptake of a photosensitizer (PS) by neoplastic tissue, followed by illumination with light of appropriate wavelength, able to trigger photochemical reactions that lead to the generation of reactive oxygen species (ROS), mainly singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), which results in tumor regression. PDT-based antitumor effects are multi-factorial and include: **i)** direct killing of tumor cells, **ii)** damage to the vasculature, and **iii)** triggering of an antitumor immune response. PDT has been approved in several countries to treat a variety of cancers such as skin, bladder, lung, breast, esophagus and cervix, among others. PDT has been also employed in various fields of medicine, including Odontology, Ophthalmology, Dermatology, Cardiology and for a large variety of localized infections that has largely been driven by the inexorable increase in antibiotic resistance, among many classes of pathogen. Furthermore, the excited PS can also serve as fluorescence imaging for photodynamic diagnosis by fluorescence imaging. The ability to accurately define tumor margins is a crucial aspect in optimization of surgical interventions. On the other hand, PDT can be exploited for addressing a number of environmental problems of high scientific and social impact: epidemic diseases of viral, bacterial, fungal or parasitic origin.

Several physical, chemical and photobiological properties are requested for an “ideal” PS agent: **i)** it should be a single pure compound with good stability and solubility in physiological media, **ii)** it should have a high absorption peak between 600-850 nm, in order to enable deeper tissue penetration for light, **iii)** PS should induce high quantum yield of $^1\text{O}_2$ production, **iv)** PS should induce negligible dark toxicity and, **v)** it should have relatively rapid clearance from normal tissues, thereby minimizing undesirable phototoxic side effects. Nowadays, there are five agents that have been approved for PDT treatments: porfimer sodium, 5-aminolevulinic acid (ALA), ALA esters, temoporfin, and verteporfin.

PSs can be localized in various organelles such as mitochondria, lysosomes, endoplasmic reticulum, Golgi apparatus and plasma membranes, and this subcellular location governs much of the signaling that occurs after PDT. There is an acute stress response that leads to changes in calcium and lipid metabolism and causes the production of cytokines and stress response mediators. Enzymes (particularly protein kinases) are activated and transcription factors are expressed. Many of the cellular responses are centered on mitochondria and frequently lead to induction of apoptosis by the mitochondrial pathway, involving caspase activation and release of cytochrome c. Certain specific proteins (such as Bcl-2) are damaged by PDT-induced oxidation, thereby increasing apoptosis, and a build-up of oxidized proteins leads to an ER-stress response that may be increased by proteasome inhibition. Studies carried out over the last decade have confirmed that PDT can evoke apoptosis, autophagy, mitotic catastrophe, and necrotic cell death pathways, depending on a variety of parameters including the nature and intracellular localization of the PS, cell genotype and PDT dose (PS concentration, light dose or both). Each of these types of cell death depends on the intracellular energy levels, and is characterized by a set of morphological and biochemical features, allowing to identify the type of death mechanism involved after a PDT treatment.

Combinations of various chemotherapeutic agents have become a commonly used strategy for cancer treatment. The low doses used for combination therapies result in lower side effects, improved treatment effects, and better outcomes than monotherapy. The development of novel target-specific

antitumor drugs has enabled examination of a number of concept-based combinations, which in various molecular mechanisms sensitize tumor cells to the cytotoxic effects of PDT.

PDT can be used in combination with a variety of currently used cancer therapies, including chemotherapy, radiation therapy, surgery, gene therapy, and immunotherapy, without compromising these therapeutic modalities. Moreover, the adverse effects of chemotherapy or radiotherapy are absent, and considering its unique $^1\text{O}_2$ -dependent cytotoxic effects, PDT can be safely combined without the risk of inducing cross-resistance. The only adverse effects of PDT relate to pain during some treatment protocols and a persistent skin photosensitization, that has been circumvented by the newer agents and tumor-target strategies. Compared with conventional cancer therapies, PDT has many advantages, including reduced long-term morbidity and the fact that PDT does not compromise future treatment options for patients with residual or recurrent disease. Moreover, PDT can be repeated without compromising its efficiency.

Combined strategies have been introduced for cancer treatments, including PDT with tumor suppressors, inhibitors and antiangiogenic drugs. Another way to enhance PDT efficacy involves an increase in PS delivery and specificity through conjugation to tumor-targeting molecules (antibodies or peptides). Thus, antibody-targeted PDT reduces the risk of phototoxicity to healthy tissues. In addition to these site-specific delivery systems, other strategies have emerged to improve PS delivery and PDT effectiveness. In this way, PS encapsulation into nanoparticles or combining PDT with agents that target signal transduction pathways seems to increase the efficacy and selectivity of PDT. However, there are few studies that have attempted to determine the effects of combination of two PSs as a new strategy.

A major challenge in PDT is the development of new PSs and drug-delivery systems that improve therapy efficacy and selectivity. To succeed in drug screening, it is crucial to use cellular systems that precisely reproduce the phenotype of the target tissue, in order to obtain reliable biomedical data that correlate with *in vivo* tests. In this way, three-dimensional (3D) cultures are particularly attractive, since they integrate chemical and mechanical signals that arise from extracellular matrix (ECM) and adjacent cells. Importantly, 3D models can mimic *in vivo* gene expression pattern and molecular gradients. These features significantly affect the outcome of PDT, enhancing the predictive power of 3D models. Therefore, PDT research should rely on the exploitation of this third dimension, guaranteeing a custom-tailor design depending on the tissue to be modeled, an easy applicability and reproducibility.

PDT continues to gain momentum as a clinically translatable stand-alone, alternative or adjunctive treatment modality for various cancers in order to reduce the possible resistance of tumor cells and minimize undesirable side effects. To this end, combination of two PSs is a new promising strategy.

1. Terapia Fotodinámica (TFD)

1.1 Fundamentos y aplicaciones de la TFD

La **terapia fotodinámica (TFD)** (en inglés PDT por *Photodynamic Therapy*) es una modalidad terapéutica clínicamente aprobada, empleada para el tratamiento de diversas patologías, todas ellas caracterizadas por una proliferación celular elevada, entre las que destaca especialmente el cáncer.¹⁻³

En los últimos años se ha avanzado en el desarrollo de nuevos fármacos antitumorales. La industria farmacéutica invierte una cantidad económica muy importante en estos proyectos, sin embargo, el desarrollo de nuevos fármacos es un proceso muy lento y complejo. Se estima que sólo el 8% de todos los fármacos candidatos que entran en fase I de ensayos clínicos, llegan a aprobarse para ser utilizados como protocolo de rutina en hospitales.⁴

Si bien la aplicabilidad y el potencial de la TFD se conoce desde hace más de cien años, el desarrollo de la TFD moderna ha sido un proceso gradual, que ha implicado el progreso científico en los campos de la Fotobiología y la Biología Celular y Molecular del cáncer, así como el desarrollo de nuevos dispositivos de Fotónica, como láseres y especialmente los LED (del acrónimo inglés, *light-emitting diode*).

La TFD ha experimentado en las últimas décadas un espectacular desarrollo en el tratamiento del cáncer, tanto con fines paliativos como curativos, con elevadas tasas de regresión completa en tumores pequeños y superficiales, que pueden ser irradiados directamente o mediante endoscopia.^{2,3} Esta opción terapéutica, está aprobada en diversos países para el tratamiento de una gran variedad de cánceres: piel, vejiga, pulmón, mama, esófago y cuello de útero, entre otros.²

Asimismo, esta terapia se está utilizando para el diagnóstico y localización de las lesiones neoplásicas (fotodiagnóstico; en inglés PD por *Photodiagnosis*), aprovechando las propiedades fluorescentes de la mayoría de los **fotosensibilizadores (FS; en inglés PS por *photosensitizer*)** utilizados en TFD (ver Fig. 1). El desarrollo de técnicas de diagnóstico temprano, es un objetivo fundamental para intentar detener el aumento progresivo de la incidencia de este tipo de patología, ya que permite la detección precoz de tumores, que podrían pasar desapercibidos. Además, esta técnica es una herramienta muy poderosa para definir con precisión los márgenes del tumor, evitando una resección en exceso del tejido sano en el caso de cánceres de cerebro y vejiga, entre otros.⁵⁻⁷

Actualmente se están llevando a cabo varios ensayos clínicos con el fin de probar la utilidad de la TFD en ciertos tumores, con significativas mejoras en cuanto al tiempo y a la calidad de vida.⁸ Asimismo, se están perfeccionando los protocolos para conseguir más autorizaciones para tratamientos basados en el empleo de FSs de tercera generación (comentados en el apartado 4.2).

La TFD no sólo se está empleando como terapia antitumoral. En los últimos años, su aplicación se ha extendido a otras áreas de la medicina, incluyendo:

- **Dermatología:** para el tratamiento de trastornos benignos de la piel (acné, psoriasis, escleroderma), con resultados cosméticos excelentes.⁹⁻¹¹
- **Oftalmología:** para el tratamiento de la degeneración macular asociada a la edad, además de otras enfermedades oculares, como la neovascularización coroidal o el hemangioma coroidal.¹²⁻¹⁴
- **Odontología:** para el tratamiento de la periodontitis.¹⁵

- **Microbiología:** para una gran variedad de infecciones localizadas, como heridas o úlceras infectadas, sinusitis y otras infecciones del tracto respiratorio, que en gran medida ha sido impulsada por el aumento inexorable de la resistencia a los antibióticos.^{16–18} Además, se utiliza para la desinfección de sangre para transfusiones o la esterilización de superficies para mantener la asepsia en hospitales o en laboratorios.¹⁹
- **Cardiología:** en el tratamiento de la aterosclerosis, la hiperplasia o la restenosis.²⁰

Las aplicaciones de la TFD no se han restringido al campo de la medicina, ya que se ha demostrado que algunos FSs son muy eficaces contra un amplio número de patógenos microbianos que generan problemas ambientales, y su uso se ha extendido a la descontaminación de aguas residuales, la desinfección de tanques de piscicultura, y el control de las poblaciones de insectos nocivos. En este último campo, las porfirinas son los FSs más utilizados, ya que presentan la propiedad de absorber prácticamente la totalidad de las longitudes de onda del espectro de emisión solar, permitiendo la utilización de los recursos naturales con importantes ahorros de energía y de bajo impacto sobre los ecosistemas.^{21,22}

Asimismo, las perspectivas futuras de la TFD se ven apoyadas por el desarrollo de nuevos equipos de fibra óptica, capaces de introducir la luz requerida en cualquier punto del organismo, con una distribución más homogénea, rompiendo la vinculación de esta terapia a los tumores superficiales.^{8,23}

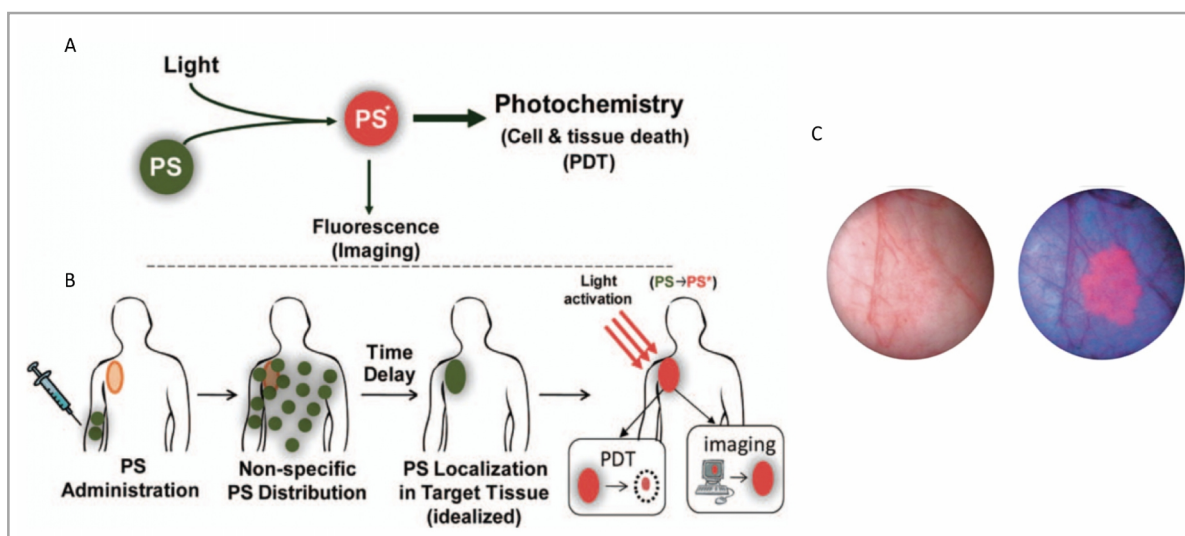


Figura 1. A-B: Representación esquemática de la TFD mostrando las diferentes funciones de un FS, que tras la activación con luz puede utilizarse tanto como un agente para análisis de imagen, así como un agente terapéutico (Tomada de Celli et al., 2010). **C:** Detección de cáncer de vejiga. La primera foto muestra el área tumoral utilizando cistoscopia estándar con luz blanca, y la segunda usando cistoscopia con Hexvix® (las células tumorales fluorescen en rojo excitando el FS con luz azul) (Tomada de <http://www.hornonline.com>).

1.2 Mecanismos de acción y componentes de la TFD

La aplicación de la TFD requiere la sucesión de los siguientes pasos:

- La administración de un compuesto fotosensible denominado **fotosensibilizador** (FS), que suele ser un compuesto fotosensible exógeno que se acumula preferentemente en el tejido tumoral.
- La posterior irradiación del área tumoral con **luz** visible, de una determinada longitud de onda que se corresponda con una de las bandas de absorción del FS. Siendo preferible la luz roja, ya que es la que presenta una mayor capacidad de penetración en los tejidos.
- Formación de **especies reactivas de oxígeno** (en inglés ROS por *reactive oxygen species*), principalmente oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), al reaccionar el FS con el oxígeno molecular, lo que conlleva a la regresión tumoral.^{8,23,24}

Es importante destacar que ninguno de estos tres elementos (FS, luz y oxígeno) es tóxico de forma individual.¹⁻³ Por lo tanto, la TFD presenta una mayor selectividad, en relación con las terapias oncológicas convencionales, ya que el daño celular queda restringido a la zona tumoral irradiada, donde se reúnen los tres agentes responsables del efecto fotodinámico, lo que conlleva una importante disminución de efectos secundarios en el organismo (ver Fig. 2).²⁵ Además, la TFD puede repetirse sin afectar a los tejidos sanos, se puede usar sola o en combinación con otros tratamientos (quimio o radioterapia) y no induce efectos mutagénicos (ver apartado 4.1).

El mecanismo de actuación de la TFD es el siguiente: al activarse el FS mediante la absorción de un fotón, un electrón pasa de un estado basal o fundamental (S_0) a un estado electrónicamente excitado o triplete (S_1), desde el cual es capaz de liberar su energía emitiendo luz (fluorescencia), mediante la conversión interna a calor o formando un estado triplete más estable (T_1). La relativa larga vida media de este estado triplete permite la interacción del FS excitado con moléculas vecinas, pudiéndose llevar a cabo dos clases de reacciones, definidas como mecanismo de Tipo I y de Tipo II.^{1,23,26}

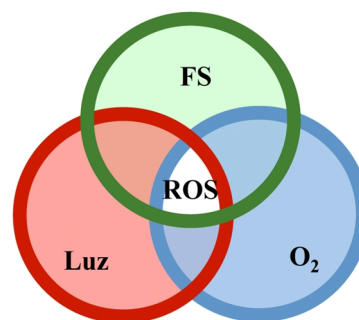


Figura 2. Componentes de la TFD.

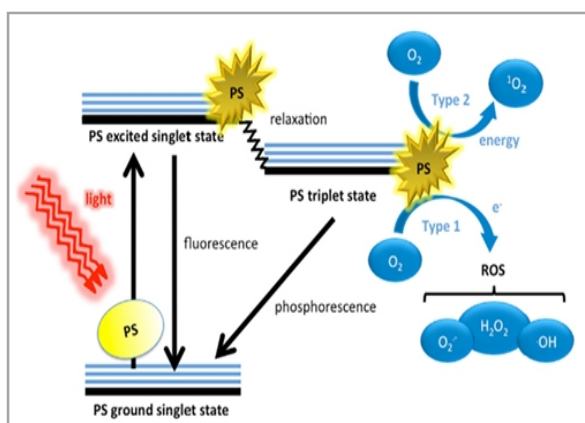


Figura 3. Diagrama de los fotoprocesos implicados en la excitación del FS. (Tomada de <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fmicb>).

En la vía de Tipo I, el FS excitado reacciona directamente con un sustrato transfiriéndole un átomo de hidrógeno o un electrón (volviendo a su estado basal), formándose radicales libres. Estos radicales, interaccionan con el oxígeno molecular, conduciendo a la formación de distintas ROS, como el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), que son agentes altamente reactivos y tóxicos, causantes de la muerte celular (ver Fig. 3).

Alternativamente, la vía de Tipo II se inicia por la transferencia directa de energía entre el estado excitado triplete del FS y moléculas cercanas de

oxígeno generándose otro tipo de ROS, el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), una forma muy reactiva del oxígeno. Ambos mecanismos son capaces de producir la foto-oxidación de ciertos residuos de aminoácidos en proteínas o de interaccionar con distintas moléculas biológicas como lípidos o ácidos nucleicos, desencadenando la muerte celular. Mientras esta vía predomina en medios ricos en O_2 , la reacción de tipo I es la principal en ambientes hipóxicos.²⁷⁻²⁹

En TFD la luz utilizada debe tener una longitud de onda adecuada para excitar al FS, pero también para penetrar profundamente en los tejidos. Teniendo en cuenta que la mayoría de los cromóforos presentes en los tejidos, absorben longitudes de onda que están entre 600 y 800 nm, la irradiación de mayor utilidad clínica está en el rango del rojo.

1.3 Fotosensibilizadores

La Figura 4 recoge los avances experimentados por la TFD desde sus inicios hasta los años más recientes. El primer FS utilizado en la TFD moderna fue la hematoporfirina (Hp), caracterizada por el físico alemán Friedrich Meyer-Betz a comienzos del siglo XX. A partir de este compuesto, Lipson y Baldes sintetizaron el derivado hematoporfirínico, HpD, preparado inicialmente por Schwartz y *et al.*, hito considerado como el inicio de la TFD moderna.³⁰

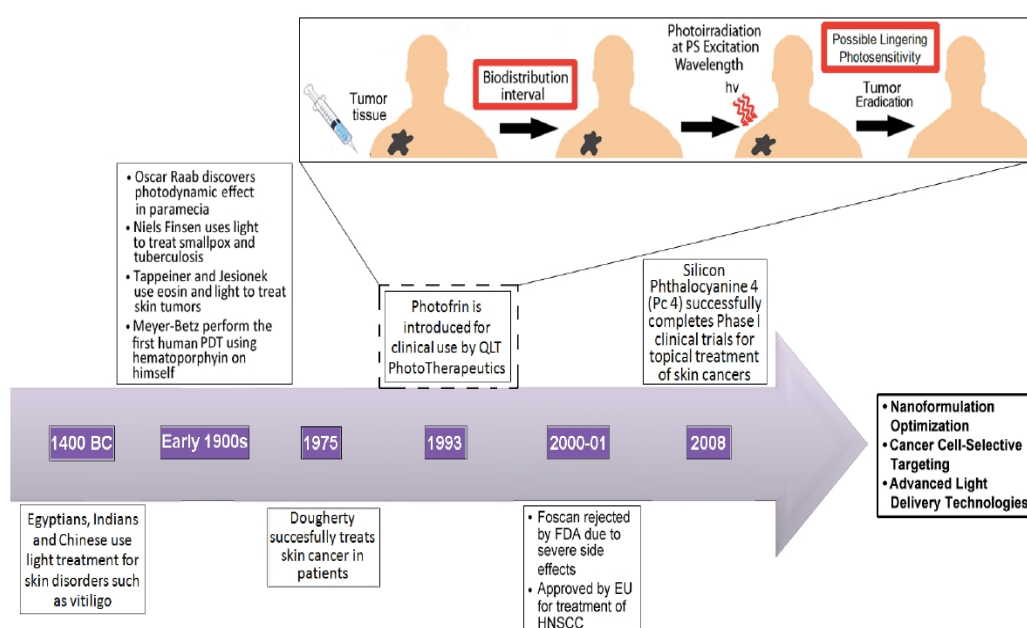


Figura 4. Historia, desarrollo y estado actual de la TFD (Tomada de Master *et al.*, 2013).

Dichos autores observaron que este compuesto se acumulaba preferentemente en las células tumorales, emitiendo una fluorescencia roja al ser excitado con luz ultravioleta, por lo que se investigó su uso para fines diagnósticos.³¹ En los años setenta, el grupo del Dr. Dougherty descubrió que el HpD irradiado con luz roja inducía la regresión de tumores de mama en ratas y ratones.³² Durante los años ochenta, Dougherty analizó la estructura de la Hp (una mezcla de porfirinas distintas), y también determinó que la transformación de la Hp en HpD por acetilación, daba lugar a nuevas porfirinas.³³ Posteriormente, caracterizó el compuesto activo del HpD, que está formado por dos porfirinas unidas

por un enlace éter, denominando a este compuesto dihematoporfirin-éter (DHE).³⁴ La TFD comenzó a recibir un mayor interés gracias al Dr. Dougherty, que ayudó a ampliar los ensayos clínicos y fundó en 1986, la Asociación Internacional Fotodinámica. Todos estos descubrimientos condujeron a la primera aprobación de un FS para su aplicación clínica en cánceres humanos, que tuvo lugar en Canadá en 1993 (seguida de los EE UU). El FS escogido fue el Photofrin®, una mezcla purificada de oligómeros del HpD, que ha resultado efectivo, pero presenta varios inconvenientes, incluyendo: tendencia a causar fotosensibilización cutánea prolongada (lo que obliga a que los pacientes, una vez sometidos al tratamiento, eviten la exposición a la luz solar de 4 a 6 semanas), escasa absorción en la zona roja del espectro (630 nm) y una composición química poco definida, lo que dificulta la identificación de su mecanismo de actuación.²³ Aún así, sigue siendo ampliamente utilizado para el tratamiento de tumores sólidos en numerosos países.¹

Estos inconvenientes han llevado a la búsqueda y caracterización de nuevos FSs más eficaces, con propiedades físicas, químicas y biológicas más adecuadas para su aplicación clínica. En los últimos años, se han desarrollado los denominados “**fotosensibilizadores de segunda generación**”, que poseen propiedades fotofísicas y fotoquímicas mejores que el Photofrin®.

De esta manera, un **FS perfecto** debería de cumplir los siguientes requisitos: i) una composición química pura con una buena estabilidad de almacenamiento y solubilidad en medios fisiológicos, ii) debe poseer un pico de elevada absorción en el rango entre 600 y 800 nm, para permitir la penetración de la luz en las zonas más profundas del tejido, iii) tener un alto rendimiento de formación de $^1\text{O}_2$, iv) no debe inducir toxicidad en la oscuridad y, v) debe eliminarse de una forma relativamente rápida de los tejidos normales, para minimizar los efectos secundarios no deseados.^{24,25}

Los FSs pueden clasificarse por distintos criterios: pureza, estructura química, generación de síntesis y localización subcelular.

Atendiendo a su **estructura química** se distinguen dos tipos principales de FSs: los derivados de porfirina y los no derivados de porfirina.²⁵ En cuanto a su desarrollo temporal, existen tres generaciones fundamentales de FSs. La primera engloba a la hematoporfirina y sus derivados (Photofrin®). La segunda incluye: clorinas, ftalocianinas, y porfírenos, entre otras moléculas.^{2,26} En la tercera generación se encuadran los FSs de ambas generaciones, pero conjugados con diversos ligandos o incorporados en nanopartículas (ver apartado 4.2).

Atendiendo a la **localización subcelular**, se han estudiado FSs mitocondriales, lisosomales y de membrana, entre otros.³⁵ La localización subcelular está determinada por las características estructurales del FS, como la carga o el grado de hidrofobicidad y de asimetría de la molécula. El mecanismo de vehiculización y la vía de internalización del FS en la célula, también influyen en la localización intracelular del mismo.

La Agencia Europea del Medicamento (en inglés EMA: *European Medicines Agency*) tiene aprobados cuatro fármacos en seis protocolos de empleo distintos para diferentes tipos de cáncer: el **Photofrin®**, el ácido 5-amino-levulínico (ALA, **Levulan®**) y su formulación metilada (**Metvix®**), y la temoporfin (**Foscan®**, un derivado de la clorina) (ver Tabla 1).

Tanto el Levulan® como el Metvix®, son precursores de la protoporfirina IX (PpIX), un FS endógeno de la ruta de síntesis del grupo hemo. Ambos fármacos se pueden aplicar tanto por vía tópica como oral, son absorbidos rápida y preferentemente por las células epidérmicas con elevada tasa de

proliferación, y una vez localizados en el interior celular, dichos precursores se convierten en el fotosensibilizante activo (PpIX). Tanto el Levulan® como el Metvix®, se emplean principalmente en Dermatología para tratar: la queratosis actínica, los carcinomas basocelulares y la enfermedad de Bowen, aunque al ser porfirinas, presentan muchos de los inconvenientes descritos para el HpD en lo referente a sus propiedades relacionadas con la absorción de luz.⁹⁻¹¹

Tabla 1. Derivados de porfirinas aprobados o en estudios preclínicos en TFD (Tomada de O'Connor et al., 2009).

Photosensitizer	Photofrin	Tookad	Foscan	Purlytin	Lutrin	NPe6	Levulan	Metvix
Absorption (nm)	630	763	652	664	732	664	635	635
Localization	Golgi apparatus, plasma membrane	Vasculature	Endoplasmic reticulum (ER), mitochondria	Mitochondria, lysosomes	Lysosome	Lysosome, endosome	Mitochondria, cytosol, cytosolic membranes	Mitochondria, cytosol, cytosolic membranes
Primary mechanism of action	Vascular damage and ischemic tumor cell necrosis	Vascular damage	Vascular damage and direct tumor cytotoxicity	Direct tumor cytotoxicity	Vascular damage and direct tumor cytotoxicity	Vascular stasis and direct tumor cytotoxicity	Direct tumor cytotoxicity	Direct tumor cytotoxicity
Most commonly employed drug-light interval	24-48 h	15 min	96 h	24 h	3 h	2-4 h	4-6 h	3 h
Clinical/preclinical application	Approved: Esophageal cancer, lung cancer, microinvasive endobronchial cancer, gastric and papillary bladder, cervical dysplasia and cancer	Clinical trials: Prostate cancer	Approved: Head and neck cancer	Clinical trials: Metastatic breast cancer, AIDS-related Kaposi sarcoma, basal cell carcinomas	Clinical Trials: Recurrent prostate cancer, cervical cancer	Approved (Japan): Early lung cancer	Approved: Actinic keratoses	Approved: Actinic keratoses, basal cell carcinoma
Most common local side effects	Mild to moderate erythema	—	Swelling, bleeding, ulceration, scarring	—	—	—	Stinging, burning, itching, erythema	Burning sensation, redness, scabbing
Most common systemic side effects	Photosensitivity, mild constipation	—	Photosensitivity	Photosensitivity	Photosensitivity (minimal)	—	—	—
Clinically approved?	Yes	No	Yes	No	No	Yes (Japan)	Yes	Yes

La temoporfina *m*-THPC, comercializada como Foscan®, se utiliza fundamentalmente para aliviar los síntomas del carcinoma epidermoide avanzado de cabeza y cuello (un tipo de cáncer que comienza en las células que recubren la boca, la nariz, la garganta o el oído). Se emplea en pacientes que dejan de responder a otros tratamientos y que no son candidatos a la radioterapia, la cirugía o la quimioterapia sistémica. Posee un coeficiente de absorción en el rojo mayor que los FSs anteriormente mencionados, por lo que requiere dosis de tratamiento menores para conseguir un efecto terapéutico comparable. Sin embargo, presenta diversos efectos secundarios (observados en más de 1 paciente de cada 10): dolor en el lugar de la inyección, hemorragia, estomatitis necrotizante, disfagia, edema facial y estreñimiento. Además, los pacientes tratados con Foscan® deben evitar la exposición a luz solar durante los seis meses siguientes a la inyección para evitar fotosensibilización cutánea. La Agencia Europea del Medicamento ha autorizado su comercialización, porque los beneficios del Foscan® superan a sus riesgos.

Además, dentro de las aplicaciones clínicas está aprobada el FS verteporfina (comercializado como Visudyne®), un derivado monoácido de la benzoporfirina (BPD-MA), que consiste en una mezcla 1:1 de dos isómeros posicionales de igual actividad farmacológica, BPD-MA_C y BPD-MA_D. Está indicado para el tratamiento la degeneración macular asociada a la edad y la neovascularización coroidal.^{13,36}

Sin embargo, ninguno de estos FSs cumple con todos los requisitos del FS ideal, siendo la caracterización de nuevos FSs, uno de los objetivos prioritarios de la TFD en la actualidad. Entre los FSs de 2ª generación que se están estudiando, algunos de ellos ya se encuentran en fase preclínica, incluyendo derivados de porfirinas, benzoporfirinas, clorinas, bacterioclorinas, ftalocianinas, naftalocianinas, porfícenos e hipericinas.^{25,26,37}

En la presente investigación se han utilizado tres FSs cuyas propiedades físico-químicas y biológicas se describen a continuación.

Las ftalocianinas (en inglés, Phthalocyanine: Pc) y sus derivados han sido intensivamente investigadas desde 1985 como FSs de segunda generación. Están estructuralmente relacionados con las porfirinas. Numerosos estudios han sido llevados a cabo durante las 3 últimas décadas, pero sólo cuatro derivados de ftalocianina han llegado a la aplicación clínica, en diferentes países: Photosens, Pc 4, ZnPc y Photocyanine. Poseen una absorción casi en el infrarrojo (670-780 nm), que es como mínimo dos órdenes de magnitud superior que la de la hematoporfirina (a 630 nm). Con apropiados átomos centrales (zinc, aluminio o silicio), las ftalocianinas muestran otras propiedades óptimas para su aplicación en PDT.

La **ftalocianina de Zinc(II) (ZnPc)** (ver Fig. 5A) empleada en nuestras investigaciones, además de una elevada absorción en la región roja del espectro visible, posee una alta estabilidad, es fluorescente y tiene un elevado rendimiento en la generación de oxígeno singlete ($\Delta\Phi = 0.7$).³⁷ Sin embargo, por su elevada hidrofobicidad requiere el empleo de transportadores especiales para su aplicación en los sistemas biológicos. La **ZnPc (CGP55847)** es la ftalocianina de zinc (ZnPc) formulada en liposomas de palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) y di-oleoil fosfatidilserina (OOPS), en una proporción de ZnPc: OPOC: OOPS de 1:90:10 (en peso). Esta formulación fue desarrollada por la empresa QLT Phototherapeutics (Vancouver, Canadá) y está patrocinada por la empresa Ciba Geigy (Novartis, Basilea, Suiza).

La ZnPc ha sido la primera ftalocianina en alcanzar los ensayos clínicos (fase I / II, Suiza) para el tratamiento por TFD del cáncer temprano en el tracto digestivo superior. Numerosas investigaciones, han demostrando una elevada eficacia de fotosensibilización, tanto *in vitro* como *in vivo*^{38–41 38–47}.

Recientemente se ha publicado una revisión de las ftalocianinas donde se recogen los mecanismos de acción, el desarrollo farmacéutico y la situación actual en investigación clínica de las mismas (ver tabla 2).⁴⁸

Tabla 2. Aplicaciones clínicas de los derivados de ftalocianina (Tomada de Jiang *et al.*, 2014).

Photosensitizer	Trade name	Wave length (nm)	Formulation	Clinical trial stage/country	Indications
Mixture of sulfonated AlPc	Photosens®	675	Distilled-water solution	Commercially available/Russia	Skin, breast, lung, oropharyngeal, breast, larynx, head and neck cancers, Sarcoma M1, epibulbal and choroidal tumors, eyes and eyelids tumors, cervical cancer
HOSiPcOSi(CH ₃) ₂ -(CH ₂) ₃ N(CH ₃) ₂	Pc 4	675	Topical administration: in propylene glycol and ethanol. Intravenous administration: in solution of Cremophor EL and ethanol.	Clinical trials (phase I)/USA	Phase I (topical administration): Actinic Keratosis, Bowen's Disease, skin cancer, or Stage I or Stage II Mycosis Fungoides (September 2004–August 2010) Phase I (Intravenous administration): Skin Cancer or Solid Tumors, metastatic to the Skin (August 2001–February 2006)
ZnPc	CGP55847	670	In liposomes composed of palmitoyl-oleoyl-phosphatidylcholine and di-oleoyl phosphatidylserine	Clinical trials (Phase I/II)/Switzerland	Squamous cell carcinoma of upper aerodigestive tract
Di-sulfonic-di-phthalimidomethyl phthalocyanine zinc di-potassium salt	Photocyanine	670	0.5 mg/mL solution of 2% Cremophor EL, 20% 1,2-propylene glycol, and 0.9% sodium chloride.	Clinical trials (Phase I)/China	Skin cancer esophageal cancer (March 2009)

Otro FS de 2ª generación empleado en el presente trabajo ha sido la porfirina catiónica *meso*-tetra(4-N-metilpiridil)porfina (**TMPyP**), (ver Fig. 5B). Como todas las porfirinas, presenta diversos picos de absorción. Uno máximo en la región azul, denominada banda de Soret ($\lambda_{\max} = 424 \text{ nm}$), pero otros menores, en la zona del verde y del rojo (concretamente a 630 nm), por lo que puede ser excitada tanto con luz roja como con luz azul. Además, se caracteriza por un elevado rendimiento en la producción de oxígeno singlete ($\Delta\Phi = 0.7$). Diversas investigaciones previas, han señalado su eficacia fotodinámica *in vitro* e *in vivo*.^{37,49–52}

El tercer FS analizado en el presente estudio, ha sido el porficeno catiónico 2,7,12-tris(α -piridinio-*p*-tolil)-17-(*p*-(metoximetil)fenil) (**Py₃MeO-TBPO**), sintetizado en el laboratorio del Dr. Nonell del Institut Químic de Sarrià (Universidad Ramón Llull, Barcelona). En la Figura 5C se muestra su estructura química.

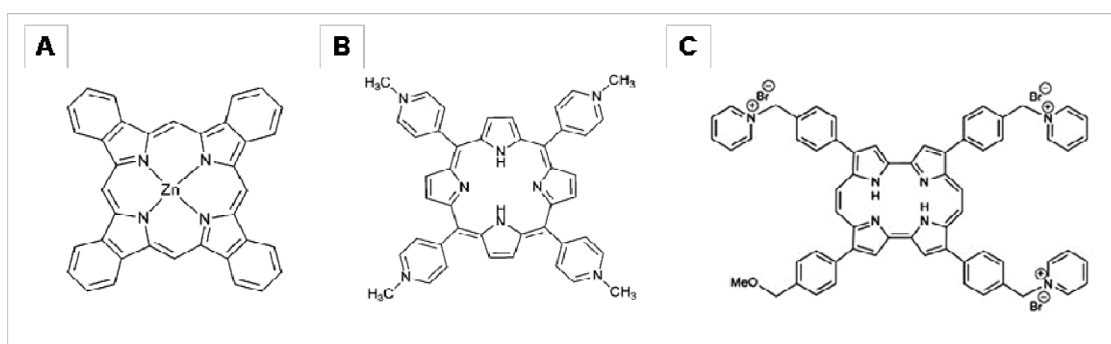


Figura 5. Estructura química de los FSs utilizados en el presente estudio: ZnPc, TMPyP y Py₃MeO-TBPO.

1.4 Regresión tumoral inducida por TFD

El objetivo principal de la TFD es la eliminación de las células tumorales. Durante las últimas décadas, de forma paralela al creciente interés despertado por la TFD como una prometedora terapia antitumoral, numerosos estudios *-in vitro* e *in vivo*- han documentado la capacidad de esta terapia, para inducir diferentes rutas de muerte celular. En los tratamientos *in vivo*, los efectos antitumorales producidos por la TFD pueden ser multifactoriales (ver Fig. 6).

La contribución relativa de estos mecanismos depende, en gran medida, de la dosis de FS (concentración y tiempo de incubación), del tiempo entre la administración del FS y la exposición a la luz y de la dosis total de luz utilizada^{1,53} e incluyen:

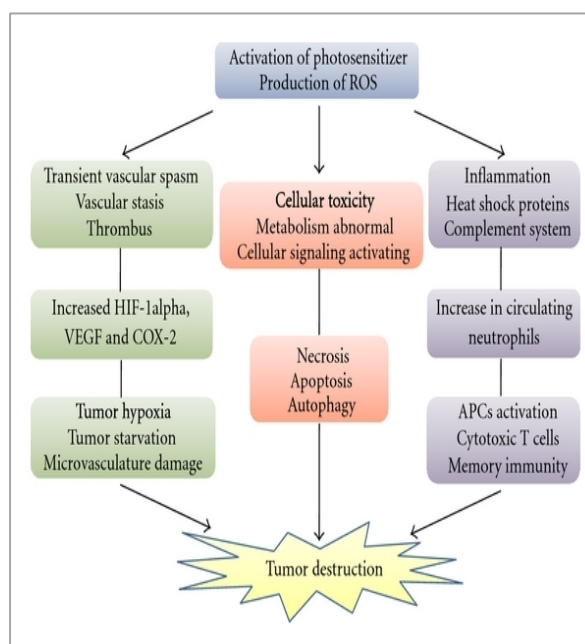


Figura 6. Mecanismos que conducen a la regresión tumoral después de un tratamiento fotodinámico. (Tomada de <http://www.hindawi.com/journals/ijp/2012/637429/fig5/>).

A) Daño directo a las células tumorales: por la acumulación preferente del FS en los tejidos neoplásicos. Los daños directos se producen cuando el FS se acumula en las células tumorales generando ROS que provocan la activación de distintas vías de muerte celular.

B) Daño a la vasculatura neoplásica: los tumores necesitan una elevada cantidad de oxígeno y nutrientes para mantener su ritmo de crecimiento, por lo que son capaces de inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos preexistentes (angiogénesis) para incrementar así su irrigación. Los tratamientos fotodinámicos pueden dañar o bloquear estos vasos sanguíneos, lo que genera un déficit de oxígeno molecular en el tejido tumoral, que ralentiza su crecimiento y favorece su destrucción. Este efecto puede potenciarse con el uso de inhibidores de la angiogénesis, para evitar la posible regeneración del tumor (ver apartado 4.2).^{54,55}

C) Activación de una respuesta inmune antitumoral. La TFD es capaz de inducir la proliferación de células inmunes con memoria. Esta capacidad de estimular una respuesta inmune es una de las grandes ventajas de la TFD sobre otras terapias antitumorales, como la quimioterapia o la radioterapia, que provocan un efecto inmunosupresivo que deja al paciente expuesto a contraer otras enfermedades.⁵⁶⁻⁵⁹

2. Mecanismos de muerte celular

A pesar de los continuos avances técnicos, hasta hace relativamente poco tiempo, la comunidad científica no ha conseguido establecer una clasificación consensuada de los distintos mecanismos de muerte celular. Los editores de la revista *Cell Death and Differentiation* crearon en 2005 un Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (en inglés NCCD por *Nomenclature Committee on Cell Death*), con el fin de establecer una unificación de criterios para identificar los distintos tipos de muerte celular, atendiendo únicamente a criterios morfológicos. Desde entonces, en sucesivas revisiones se han clasificado estos mecanismos atendiendo a los últimos avances en este campo de investigación. En 2007, el Comité estableció que los distintos tipos de muerte se basaran según cuatro criterios generales: morfológicos, enzimáticos, funcionales e inmunológicos.⁶⁰ En la última publicación de 2012, el Comité establece una definición y clasificación de las principales modalidades de muerte celular en base a características bioquímicas precisas y cuantificables. Asimismo, hace referencia a la existencia de otra serie de modalidades de muerte celular que aún están en discusión.⁶¹

En términos generales, los criterios morfológicos siguen siendo el mejor criterio para determinar qué tipo de ruta de muerte celular se desencadena en una célula, puesto que permiten distinguir de una forma bastante precisa entre los principales mecanismos de muerte celular.^{60,62,63} Una vez determinada la ruta de muerte, los estudios bioquímicos y moleculares nos permiten caracterizar los mecanismos precisos a través de los que se produce la inactivación celular.⁶¹ En la Tabla 3, se recogen los 4 principales tipos de mecanismos de muerte propuestos junto con sus características morfológicas.^{60,64}

Tabla 3. Características morfológicas de los principales tipos de muerte celular (Tomada de Galluzzi et al., 2007).

Cell death mode	Characteristic morphological aspects	Notes
Apoptosis (Type 1)	<ul style="list-style-type: none"> ● Rounding up of the cell ● Reduction of cellular and nuclear volume (pyknosis) ● Retraction of pseudopodes ● Nuclear fragmentation (karyorrhexis) ● Little modification of cytoplasmic organelles ● Plasma membrane blebbing 	'Apoptosis' is the original term introduced by Kerr et al. ⁴⁴ to define a cell death with specific morphological features.
Autophagy (Type 2)	<ul style="list-style-type: none"> ● Lack of chromatin condensation ● Massive vacuolization of the cytoplasm (double-membraned autophagic vacuoles) 	'Autophagic cell death' defines cell death occurring with autophagy, though it may misleadingly suggest a form of death occurring through autophagy. ⁴⁵
Necrosis (oncosis) (Type 3)	<ul style="list-style-type: none"> ● Cytoplasmic swelling ● Rupture of plasma membrane ● Swelling of cytoplasmic organelles ● Moderate chromatin condensation 	'Necrosis' identifies, in a negative fashion, cell death lacking the features of apoptosis or autophagy, and usually appears as oncosis. ⁴⁶
Mitotic catastrophe	<ul style="list-style-type: none"> ● Micronucleation ● Multinucleation 	'Mitotic catastrophe' refers to a cell death occurring during or shortly after a failed mitosis. ¹¹

A continuación, se comentarán las características más importantes de los principales mecanismos de muerte celular (especialmente de la apoptosis por su implicación en la presente investigación), de forma previa a su participación dentro del campo de la TFD.

○ APOPTOSIS

En 1972, Kerr, Wyllie y Currie utilizaron por primera vez el término apoptosis (del griego, apo, separar y ptosis, caer), que hace referencia a la caída de las hojas de los árboles en otoño, para designar la muerte celular programada o apoptosis, como el conjunto de las características morfológicas que mostraban las células que morían durante el programa de desarrollo de los organismos multicelulares.⁶⁵

La apoptosis es un proceso programado de muerte que puede desencadenarse principalmente por dos rutas de señalización distintas, la vía extrínseca y la vía intrínseca, en las cuales se necesitan una serie de moléculas para su desarrollo, entre las que destaca la familia de las caspasas.⁶⁶ Sin embargo, como veremos más adelante, existen otras vías de señalización, que no implican la actividad de las caspasas, son las denominadas vías independientes de caspasas.

Existen una serie de **características morfológicas** que acompañan a la apoptosis: reducción del volumen celular y nuclear, condensación de la cromatina, fragmentación internucleosómica del ADN, escisión de las proteínas del citoesqueleto, fragmentación celular y formación de cuerpos apoptóticos.^{61,62}

En los organismos multicelulares, una vez que la célula muere por apoptosis, sus restos son endocitados por células fagocitarias. Para ello las células apoptóticas presentan una serie de señales bioquímicas, como la translocación de la fosfatidilserina.⁶⁷ Este reconocimiento permite mantener la homeostasis celular, estimulando la producción de sustancias anti-inflamatorias y evitando la liberación de citoquinas proinflamatorias.⁶⁸

La apoptosis requiere la participación de las **caspasas** (del inglés: *cysteine-dependent aspartyl-specific proteases*). Esta familia de proteasas se caracteriza por tener una cisteína en su centro activo y romper sus moléculas diana por residuos de ácido aspártico. Son las proteínas responsables de las características morfológicas de la apoptosis.⁶⁹

Las caspasas se localizan principalmente en el citoplasma de forma inactiva (zimógenos inactivos: procaspasas). Existen más de una docena de caspasas, de las que únicamente están implicadas en

procesos apoptóticos las caspasas 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10 (Fig. 7).^{70,71} Otras están implicadas en procesos relacionados con el mantenimiento de la homeostasis celular, como la diferenciación, la proliferación o la producción de citoquinas.⁷²

En relación con su implicación en la muerte celular, se distinguen dos tipos principales de caspasas: las iniciadoras y las efectoras. Las iniciadoras son capaces de reconocer el estímulo de muerte y autoactivarse, proceso en el que intervienen distintos complejos multiproteicos, tales como el apoptosoma o DISC (del inglés: *Death-inducing signalling complex*). Las principales son las caspasas 2, 8, 9 y 10. Las efectoras se activan por las caspasas iniciadoras y se encargan de escindir los sustratos celulares en la apoptosis. Las más estudiadas son la 3, la 6 y la 7.

Además, en la muerte por apoptosis también participan las proteínas **IAPs** (proteínas inhibidoras de la apoptosis), que se encargan de la inhibición directa de las caspasas activas mediante dominios de interacción específicos.⁷³

Por otra parte, conviene destacar a la familia de proteínas **Bcl-2** (proteína 2 del linfoma de células B, del inglés: *B-cell lymphoma 2*) que se encargan de la regulación de la apoptosis. Estas proteínas se caracterizan por poseer una serie de dominios conservados, conocidos como BH, de los que se han descrito cuatro variantes: BH1, BH2, BH3 y BH4, así como un dominio transmembrana carboxi-terminal (TM) (ver Fig. 8).^{72,74,75} Esta familia de protooncogenes consta de:

- Miembros antiapoptóticos, que poseen los cuatro dominios, como: Bcl-2 y Bcl-XL, entre otros. Éstos promueven la supervivencia celular al secuestrar a los miembros proapoptóticos sólo BH3, los cuales sólo se separan de éstos tras ser activados por una señal de estrés celular, para activar a los miembros proapoptóticos y desencadenar la apoptosis.
- Miembros proapoptóticos con multidominios BH (BH1, BH2, BH3) como Bax y Bak, entre otros.
- Miembros proapoptóticos con sólo el dominio BH3, como Bim, Bad, Bid y PUMA (del inglés: *p53 upregulated modulator of apoptosis*).

Los miembros antiapoptóticos, en general, son proteínas de la membrana mitocondrial externa que inhiben la apoptosis al evitar la liberación de las moléculas del espacio mitocondrial al citosol (como el citocromo c). Estas proteínas determinan la supervivencia celular y su sobreexpresión está relacionada con el cáncer y la progresión tumoral.

Dentro de los miembros proapoptóticos, destaca la proteína Bax (proteína X asociada a Bcl-2), la cual se encuentra en el citosol de forma inactiva. Tras un estímulo apoptótico, Bax sufre un cambio conformacional, se activa y oligomeriza. El resultado del desplazamiento del equilibrio de las proteínas Bcl-2 hacia la apoptosis, es la liberación de proteínas solubles desde el espacio intermembrana mitocondrial, encargadas de la activación de las caspasas y de la inhibición de las IAPs, como el citocromo c y Smac (segundo activador de las caspasas derivado de la mitocondria, del inglés *second mitochondria-derived activator of caspase*), también llamada DIABLO (del inglés: *Direct Inhibitor of Apoptosis-Binding protein with LOW pI*), debido a que se produce la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (en inglés MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*).

Para la activación de éstos, juegan un papel muy importante las proteínas proapoptóticas sólo BH3, como Bad y Bid, que se encargan de inhibir a las proteínas antiapoptóticas y promover así la activación de Bak y Bax. Estas proteínas, una vez activadas, no sólo son capaces de actuar sobre la

membrana mitocondrial, sino que pueden actuar, también, sobre el retículo endoplasmático (RE) y liberar iones Ca^{2+} , participando en el desarrollo de la vía intrínseca apoptótica. Además, la proteína Bid, como veremos más adelante, tiene un papel de mediador entre la vía extrínseca y la vía intrínseca de la apoptosis. ⁷⁶⁻⁷⁸

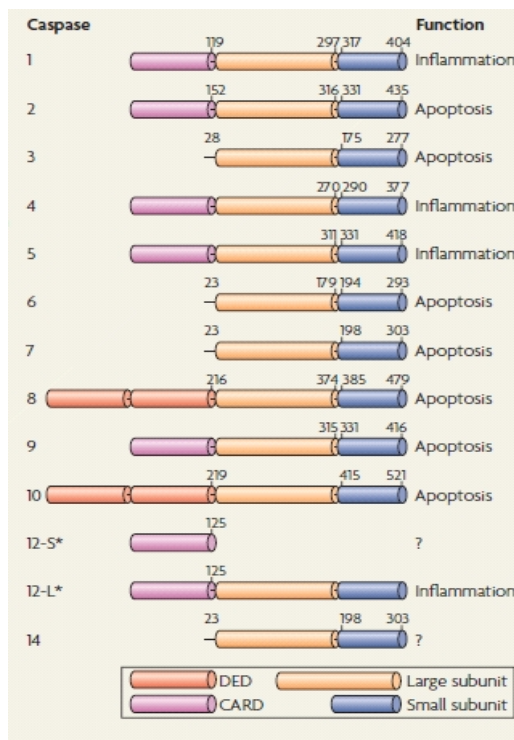


Figura 7. Representación esquemática de los distintos tipos de caspasas y sus dominios (Tomada de Taylor et al., 2008).

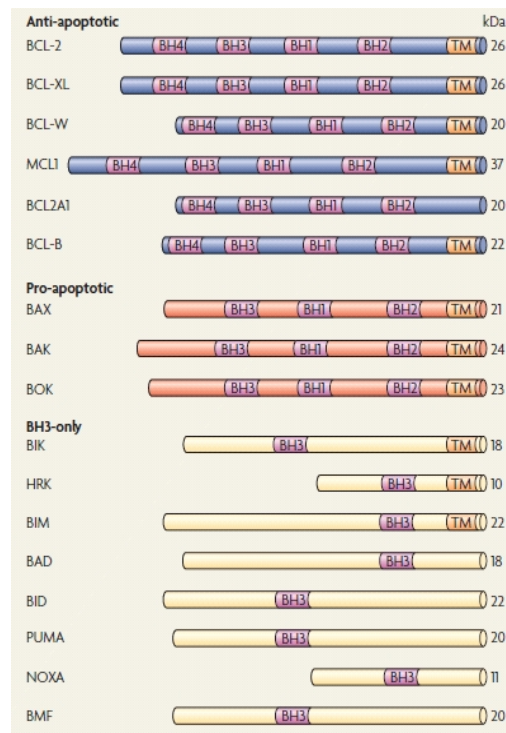


Figura 8. Representación esquemática de los distintos miembros de la familia Bcl-2 y sus dominios (Tomada de Taylor et al., 2008).

En mamíferos podemos distinguir tres grandes **rutas de señalización de la apoptosis**, estas rutas son interdependientes y acaban convergiendo en las etapas finales (ver Fig. 9):

A.- Vía de señalización por receptores de muerte o vía extrínseca. Se desencadena a través de la familia de los receptores de muerte TNF (factor de necrosis tumoral, del inglés: *tumor necrosis factor*). Existen seis tipos diferentes de receptores, todos son homotriméricos y se caracterizan por tener un dominio extracelular de unión a un ligando, un dominio transmembrana de paso único y un dominio de muerte intracelular (DD).

La ruta de señalización más característica, es la iniciada por Fas (receptor 6 de la superfamilia del factor de necrosis tumoral). Cuando el ligando de Fas (FasL) se une de manera trimérica a su receptor, se reclutan moléculas adaptadoras desde el citosol: FADD (dominio de muerte asociado a Fas, del inglés: *Fas-associated death domain*) y RIP1 (del inglés: *receptor-interacting protein-1*), que permiten, a su vez, el reclutamiento de la procaspasa 8 ó 10 formándose la plataforma de muerte DISC (del inglés: *death-inducing signalling complex*), encargada de iniciar la apoptosis.

Las caspasas 8 ó 10 al autoactivarse, inducen la activación de la caspasa 3 (promoviendo la hidrólisis de diversos sustratos), o bien la caspasa 8 puede escindir a Bid inactivo en el citosol, que al perder un fragmento polipeptídico, pasa a tBid (Bid truncado), que se dirige a la mitocondria produciendo la MOMP, lo que induce la liberación de una serie de proteínas desde el espacio intermembrana de la mitocondria al citosol, como se comentará a continuación. Por otra parte, las FLIPs (del inglés: *FLICE-like inhibitory proteins*) son proteínas inhibidoras de la apoptosis mediada por receptores de muerte, ya que son homólogos estructurales de la procaspasa 8, y compiten con ella en la unión a la plataforma de muerte DISC.

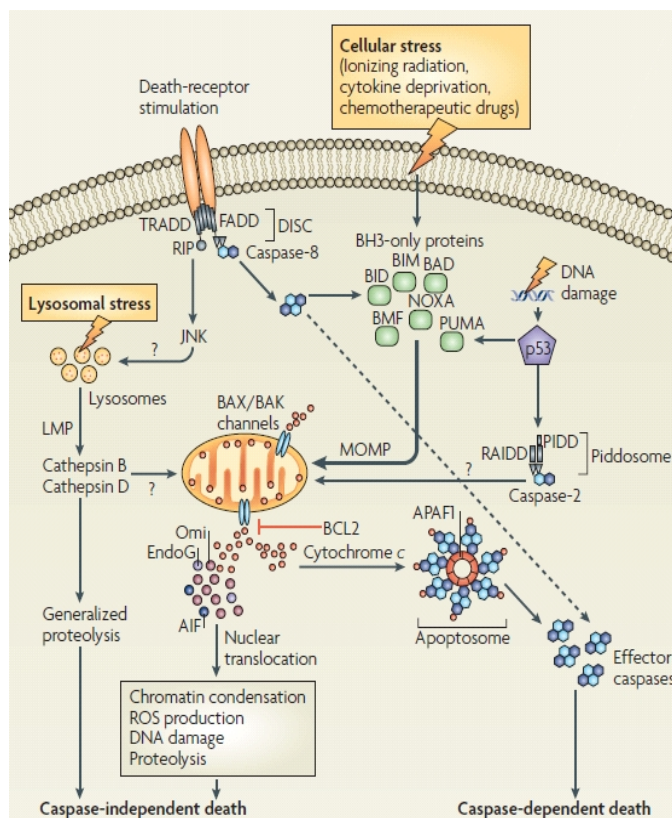


Figura 9. Representación de las rutas, tanto dependientes como independientes de caspasas, que desencadenan la apoptosis (Tomada de Taylor et al., 2008).

B.- Vía mitocondrial (o intrínseca) dependiente de caspasas. Es inducida por señales de estrés intracelular, tales como, un estrés oxidativo, un incremento de Ca^{2+} en el citosol o la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE. La vía intrínseca está altamente regulada por las señales antiapoptóticas y proapoptóticas que están ejecutadas por la familia de las Bcl-2. Para mantener el equilibrio y la estabilidad en la membrana mitocondrial convergen ambos tipos de señales, pero el aumento de las señales proapoptóticas es lo que desencadena la MOMP y el comienzo de la cascada de señalización de la apoptosis intrínseca.⁷⁶

La MOMP se debe a que los miembros proapoptóticos de la familia de Bcl-2, Bak y Bax se oligomerizan y forman poros en la membrana mitocondrial externa, este es un paso decisivo para el desarrollo de esta ruta apoptótica. Cuando se forma un poro en la membrana mitocondrial el agua pasa a través de él, provocando la rotura de la membrana externa y la liberación de las moléculas que contiene este espacio. La MOMP es irreversible, ya que conlleva una serie de consecuencias letales para la célula como: la disipación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), el cese de la síntesis de ATP y la liberación de proteínas citotóxicas del espacio mitocondrial, como: el citocromo c, Apaf-1 (del inglés: *Apoptosis protease-activating factor-1*), el factor inductor de la apoptosis (en inglés AIF por *apoptosis-inducing factor*), la endonucleasa G (endoG), Htrpa2 (del inglés: *high temperature requirement protein A2*) también conocida como Omi y Smac/DIABLO.⁷⁹ Esta liberación permite el

ensamblaje del apoptosoma, lo que tendrá como resultado final la activación de las caspasas 9 y 3, desencadenando la apoptosis de forma similar a lo que ocurre en la vía extrínseca.

La liberación del citocromo c provoca la inactivación de la cadena respiratoria, que en consecuencia, hace que aumente la cantidad de ROS en el citosol y de este modo se amplifica la señal apoptótica. Este punto de la vía es de vital importancia, ya que sin la liberación de estas moléculas desde la mitocondria, no se activan las caspasas y la cascada de señalización no continúa hacia adelante.^{80,81}

Una vez liberadas estas moléculas se forma el apoptosoma, para activar a las caspasas efectoras 3 y 7. El apoptosoma es una plataforma de muerte indispensable para que se lleve a cabo la vía intrínseca de la apoptosis. Está compuesto por el dominio de reclutamiento de caspasas (CARD) que contiene a Apaf-1 y al citocromo c. A este complejo heptamérico circular se une dATP (desoxiadenosín trifosfato) y la caspasa 9 dándole la capacidad catalítica.

La caspasa 3 es capaz de activar al enzima CAD (DNasa activada por caspasa), mediante la escisión de su inhibidor: ICAD (del inglés: *inhibitor of caspase-activated DNase*), haciendo posible la entrada de ésta en el núcleo, dónde cataliza la fragmentación nucleosomal del ADN (ver Fig. 10). Este evento no es exclusivo de la apoptosis mediada por caspasas, puesto que otras proteasas no-caspasas, también pueden activar la cascada ICAD → CAD, induciendo a la fragmentación nucleosomal del ADN. La caspasa 3 activa también provoca la fragmentación del enzima PARP (poli-ADP-ribosa polimerasa), un enzima

encargado de reparar el ADN dañado, entre otros sustratos celulares. En este proceso se necesita adenosín trifosfato (ATP) o dATP.

Una vez que las caspasas efectoras son activadas existen numerosas dianas sobre las que éstas actúan. Una de las dianas más importantes es el citoesqueleto, en concreto las caspasas actúan sobre una proteína de la familia Rho, ROCK1 (del inglés: *Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1*), que se encarga de controlar la dinámica del citoesqueleto de actina y hace que se pierda la estabilidad de éste, provocando deformaciones de la membrana plasmática, proceso conocido como “blebbing”.

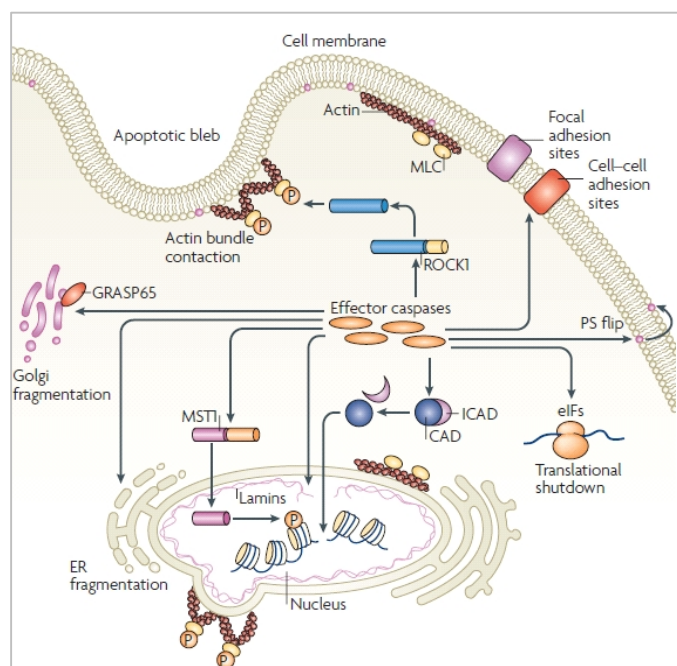


Figura 10. Esquema de algunos sustratos celulares de las caspasas ejecutoras (Tomada de Taylor et al., 2008).

Por otro lado, las caspasas se encargan de la proteólisis de las laminas A, B y C de la envoltura nuclear, provocando su desensamblaje, lo que tiene como consecuencia la pérdida de la integridad nuclear. Además, la fosforilación de MST1, en mamíferos, hace que un fragmento catalíticamente activo se transloque al núcleo y participe en la condensación de la cromatina. Las caspasas también ayudan a la pérdida del contacto de la célula con su matriz extracelular (MEC) interviniendo en la proteólisis de

proteínas que forman parte de las uniones entre la célula y la matriz. Además, se encargan de la externalización de la fosfatidilserina. Es importante destacar, que también están relacionadas con la escisión de múltiples factores de transcripción (eIFs) y son las responsables de la fragmentación de orgánulos como el RE y el aparato de Golgi (activación de la proteína GRASP65).^{70,72,82}

C. Vía intrínseca independiente de caspasas. Como se ha mencionado anteriormente, cuando se permeabiliza la membrana mitocondrial, se liberan al citosol: las endoG, las AIF y Omi, que tienen la capacidad de dirigirse al núcleo y mediar por sí solas la fragmentación y condensación del DNA.^{2,80} Por otra parte, la función de Htra2/Omi y Smac/DIABLO es inhibir la actividad de las IAPs para que las caspasas puedan realizar su función, pero además, Htra2/Omi es capaz de intervenir en la ruta independiente de caspasas, ya que tiene actividad proteasa.⁶¹

Este último punto es el que más polémica científica sigue suscitando. De esta manera, ciertos investigadores han puesto en entredicho a las caspasas como “punto de no retorno” y han propuesto que sea, la pérdida de la integridad de la membrana mitocondrial.⁸³ En 2005, el comité NCCD definió dicho “punto de no retorno” (aunque no les guste el término) como “de activación de proteasas en general” (incluyendo así a las catepsinas lisosomales, entre otras), insistiendo siempre en la aplicación de criterios morfológicos, hasta que las rutas bioquímicas no estén completamente esclarecidas.⁶⁰

Además de las rutas que acabamos de describir, se pueden activar otras vías que también desencadenan la apoptosis de una forma independiente de caspasas. Por otra parte, puede ocurrir que el incremento de ROS después del tratamiento fotodinámico, induzca la permeabilización de la membrana lisosomal (en inglés LMP por *lysosomal membrane permeabilization*). Cuando esto sucede, se liberan al citosol las proteasas lisosomales (catepsinas, destacando a las catepsinas B y D) que desencadenan una apoptosis independiente de caspasas, aunque también pueden introducirse en la mitocondria y desencadenar la vía mitocondrial de la apoptosis, incluyendo: la escisión de Bid, la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas 9 y 3.² Además se ha visto que algunas catepsinas tienen la capacidad de activar a Bax o Bak siguiendo una ruta, por tanto, dependiente de caspasas.^{80,84–88}

○ NECROSIS

Tradicionalmente, la necrosis ha sido considerada un mecanismo de muerte celular accidental, no programado y sin ningún tipo de regulación, inducido en respuesta a un daño intenso.⁶⁶ A nivel morfológico se caracteriza por las siguientes características: disminución del volumen celular, moderada condensación de la cromatina, desorganización masiva de los orgánulos celulares, rápida pérdida de la integridad de la membrana plasmática (lo que provoca entrada de agua en la célula), formación de grandes deformaciones en la superficie celular y la liberación de contenido intracelular (destacando las moléculas denominadas alarminas, un tipo de DAMPs, del inglés, *damage-associated molecular patterns*) induciendo una respuesta inflamatoria.^{2,89–91}

Sin embargo, estudios recientes han puesto de manifiesto que la necrosis puede tener lugar de una manera regulada, jugando un importante papel a nivel fisiológico y patológico.^{91,92} El término necrosis regulada engloba distintos mecanismos que se producen en respuesta a agentes de diversa naturaleza

(estrés oxidativo, exposición a ciertos patógenos o incremento de los niveles intracelulares de Ca^{2+} , entre otros), y en los que participan diferentes rutas de señalización y moléculas, algunas de las cuales también intervienen en procesos apoptóticos o autofágicos.

Un mecanismo de necrosis regulada es la **necroptosis** (ver Fig. 11). Se ha observado que cuando se inhiben las caspasas, especialmente la caspasa 8, la unión de determinados ligandos a receptores de muerte (como TNFR1 o Fas), puede disparar la activación de este proceso necrótico regulado.^{90,92,93}

Este mecanismo está mediado por un complejo proteico, el necrosoma, formado por dos serina-treonina quinasas con un dominio de muerte: RIP1 y RIP3. RIP3 funciona como un interruptor molecular entre la necroptosis inducida por receptores de muerte y la apoptosis, a través de la formación del complejo multiproteico RIP1-RIP3 (necrosoma). La unión de RIP1 a RIP3 es inhibida por la molécula necrostatina 1, lo que indica que la actividad quinasa de RIP1 es indispensable para el ensamblaje del necrosoma.⁹⁴⁻⁹⁶ Sin embargo, el mecanismo subyacente que decide entre apoptosis o necroptosis no se ha clarificado totalmente.⁹³

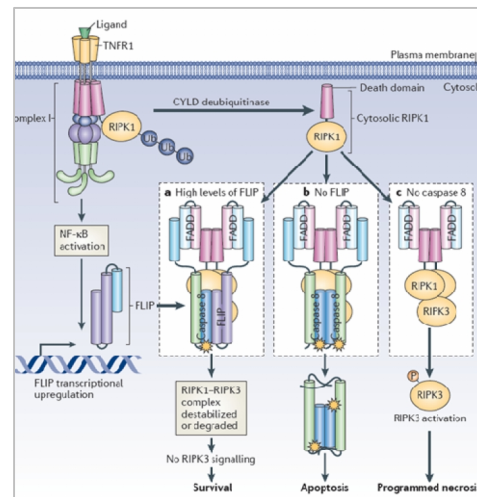


Figura 11. El reclutamiento de la caspasa 8 y FLIP a un complejo que contiene RIPK1-determina el destino celular (Tomada de Oberst y Green, 2011).

○ AUTOFAGIA

La autofagia es un mecanismo celular catabólico que permite a la célula mantener un equilibrio entre la síntesis, degradación y reciclaje de productos celulares, con un importante papel en el desarrollo y la homeostasis tisular.

El término autofagia fue descrito por primera vez en 1963 y se trata de una ruta exclusiva de los organismos eucariotas.^{66,97} Este proceso se caracteriza morfológicamente por una vacuolización masiva del citoplasma, debido a la formación de unas estructuras que se rodean de doble membrana denominadas autofagosomas y por una ausencia de condensación de la cromatina. Estas vesículas se fusionan con los lisosomas, formándose autofagolisosomas, que constan de una membrana sencilla, de forma que el contenido de las vesículas es degradado por acción de las hidrolasas lisosomales (ver Fig. 12). Estos procesos están controlados por las proteínas de la familia de genes relacionados con la autofagia (en inglés Atg, por *autophagy-related gene family proteins*) como Beclina1/Atg6 o Atg8/LC3.^{66,98,99}

La autofagia fue inicialmente descrita como un mecanismo de supervivencia celular en respuesta al estrés causado por la escasez de nutrientes, de modo que el ADN dañado, las proteínas disfuncionales y los orgánulos alterados, podían disociarse en nucleótidos, aminoácidos y ácidos grasos, que se reciclaban para sintetizar las macromoléculas y el ATP necesarios para que la célula pueda continuar con las funciones básicas.⁹⁹ Sin embargo, sus funciones abarcan otros aspectos como, el envejecimiento, el cáncer o la inmunidad.^{100,101}

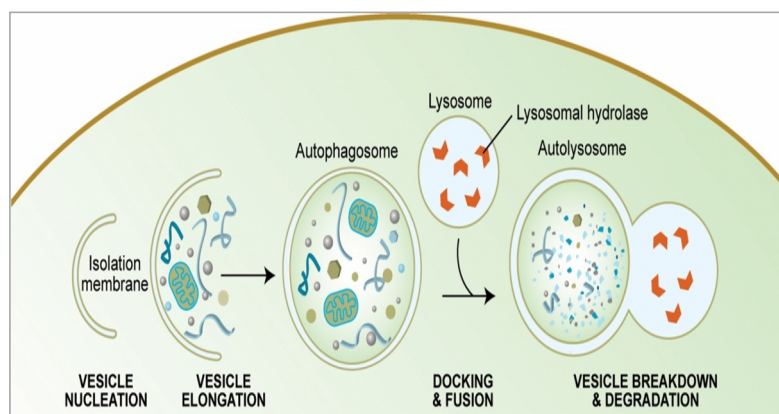


Figura 12. Representación de las etapas de la autofagia (Tomada de www.wormbook.org).

Además de los tres mecanismos de muerte comentados, existen una serie de rutas de muerte celular, cuya clasificación no está del todo definida.⁶¹

Entre estos mecanismos destaca la **catástrofe mitótica**, que hace referencia a un tipo de muerte celular que ocurre durante o poco después de una mitosis aberrante o fallida. Suele ir acompañada de alteraciones morfológicas incluyendo: micronucleación (que a menudo es el resultado de cromosomas y/o fragmentos de cromosomas que no han sido distribuidos equitativamente entre los núcleos hijos) y multinucleación (presencia de dos o más núcleos con tamaños similares o heterogéneos, derivados de una separación deficiente durante la citocinesis).^{39,61,102} Según el propio NCCD, no se trata de un mecanismo de muerte celular propiamente dicho, ya que finaliza con la muerte de la célula, generalmente por apoptosis, necrosis o la entrada de ésta en senescencia.

Finalmente, comentaremos muy brevemente la **muerte celular por anoikis** (ver Fig. 13). El término anoikis, ("el estado de estar sin hogar"), fue introducido por Frisch y Francisco en 1994 para describir la respuesta apoptótica de las células adherentes inducida por la pérdida de la interacción con la MEC o con las células vecinas. Cabe señalar que en la mayoría de los casos, el programa de muerte celular activado por anoikis es ejecutado por la maquinaria molecular de la apoptosis intrínseca. El NCCD reconoce el uso de este término por razones históricas, ya que está bastante difundido en la literatura.^{61,103-105} La supervivencia de las células adherentes no transformadas depende de señales transducidas por integrinas y por algunos receptores de factores de crecimiento, tales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico

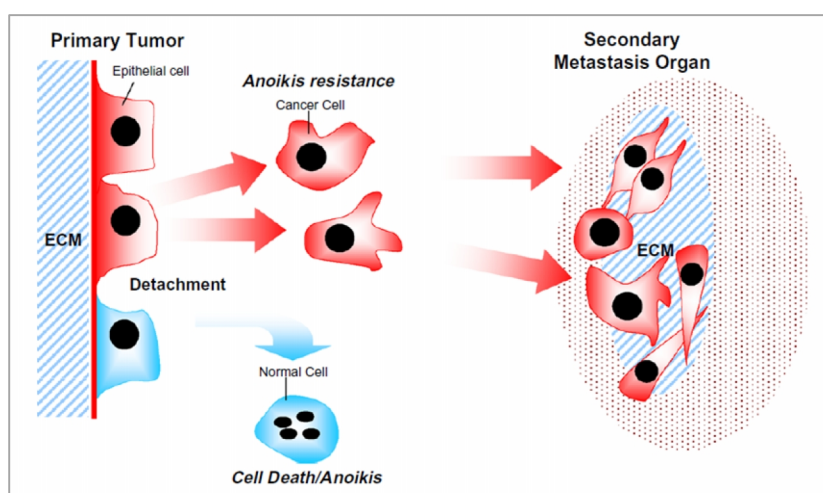


Figura 13. Adhesión celular y muerte por anoikis (Tomada de Sakamoto y Kyprianou, 2010).

(EGFR), tras la interacción con la matriz extracelular. La resistencia a la anoikis, característica de las células tumorales epiteliales, está relacionada con su capacidad de invasión y metástasis.

3. TFD y muerte celular *in vitro*

Numerosos estudios realizados en cultivos celulares han demostrado que diversos orgánulos y estructuras celulares pueden verse afectados, por el proceso fotodinámico mitocondrias, lisosomas, aparato de Golgi, RE, la membrana plasmática y el citoesqueleto.^{2,42,66,106} El estrés oxidativo generado por la TFD induce un fallo metabólico, ligado al punto de acumulación del FS, que activa las rutas de señalización que conducen al disparo de diversas vías de muerte celular. El daño a estas estructuras celulares está directamente relacionado con la localización del FS, ya que el $^1\text{O}_2$ generado durante la TFD tiene una vida media muy corta en las células (aproximadamente 1×10^{-7} s) y su radio de acción no excede de los 30 nm.¹⁰⁷ Por lo tanto, el daño fotodinámico primario, se produce muy cerca de la ubicación intracelular del FS.

El grado de citotoxicidad después de un tratamiento de TFD, es crucial en la determinación del tipo de muerte celular que será inducido, y depende: del tipo y dosis del FS utilizado, de su localización subcelular, del tiempo transcurrido entre la administración del FS y la exposición a la luz, así como de la dosis de luz. Por otra parte, también el tipo de tumor y su nivel de oxigenación son factores determinantes en la respuesta *in vivo* a la PDT.¹

Diversas revisiones han mostrado que la TFD puede producir diferentes tipos de muerte celular, siendo los principales: la apoptosis, la necrosis y la autofagia.^{1,2,66} La mayoría de las respuestas celulares centradas en la mitocondria conducen con frecuencia a la inducción de la **apoptosis** de manera rápida y directa, ya que en estos orgánulos reside el sistema de regulación de la ruta apoptótica intrínseca. Por ello, los FSs de localización mitocondrial pueden provocar la inactivación celular por esta vía de muerte,⁶⁶ aunque en algunos casos pueden desencadenar un proceso autofágico (ver Fig. 14).¹⁰⁸⁻¹¹¹

Los FSs de localización lisosomal, como la N-aspartil clorina e6 (NPe6) o la porfirina catiónica *meso*-tetra(4-N-metilpiridil)porfina (TMPyP), también pueden inducir apoptosis por una vía indirecta.

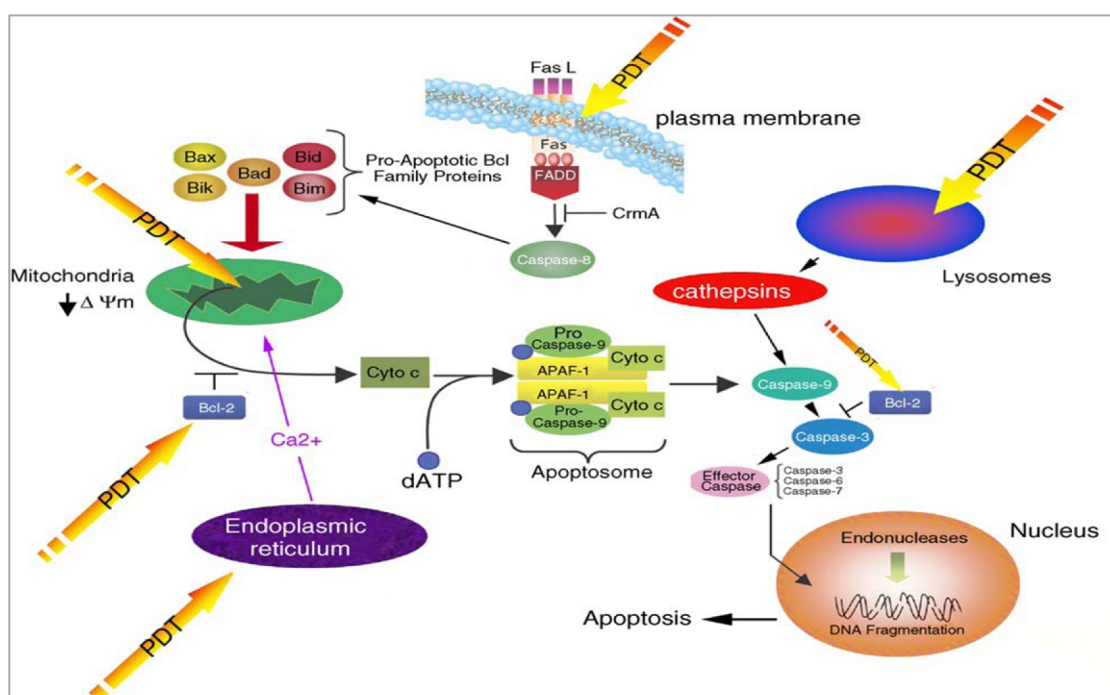


Figura 14. Vías de señalización celular en función de la localización del FS que conducen a la inducción de la apoptosis (Tomada de Castano y et al., 2005).

Los lisosomas pierden su integridad de membrana después del tratamiento fotodinámico y se liberan al citosol proteasas lisosomales, que son inactivadas en su mayoría por inhibidores endógenos y por el pH más básico del citoplasma, aunque parte de estas enzimas, como las catepsinas, pueden llegar a interactuar con moléculas proapoptóticas como Bid, induciendo un proceso apoptótico retrasado (ver apartado 2).^{87,88,112,113}

Los FSs de membrana (como la ftalocianina de aluminio, AlPc, o el Photofrin®) se caracterizan por inducir preferentemente muerte celular por vía necrótica aunque también se ha descrito que son capaces de desencadenar la apoptosis. Asimismo, se han estudiado FSs que se localizan en el RE, pero son menos conocidos. En el RE residen los mecanismos de regulación de la homeostasis del calcio, implicado en el control de la muerte celular, de modo que algunos FSs pueden causar una liberación masiva de Ca^{2+} capaz de desencadenar la apoptosis por la vía intrínseca, debido a la degradación de la proteína antiapoptótica Bcl-2, localizada tanto en mitocondrias como en el RE.¹¹⁴

A partir de FSs localizados en el aparato de Golgi (como la ftalocianina de Zinc(II), ZnPc), también se puede desencadenar la muerte celular. Varios estudios han mostrado que en algunas líneas celulares (por ejemplo HeLa), el aparato de Golgi es capaz de actuar como un señalizador proapoptótico o inducir catástrofe mitótica, en respuesta al estrés oxidativo producido por los tratamientos fotodinámicos.^{38,39,42,43,46,113,115,116}

Además, el citoesqueleto también puede ser una diana de la TFD. Algunos FSs alteran el citoesqueleto de los microtúbulos (MTs), provocando su despolimerización o induciendo alteraciones del ciclo celular. También los microfilamentos de actina (MFs) pueden verse afectados por los tratamientos fotodinámicos.^{37,117–119}

El estudio de los factores y parámetros que desencadenan la **necrosis** después de la TFD, resulta más complejo que el análisis de los factores que conducen a la apoptosis. Sin embargo, una alta dosis de TFD (ya sea por una elevada concentración de FS o por una elevada dosis de luz) tiende a provocar muerte celular por necrosis, ya que la gran cantidad de $^1\text{O}_2$ liberado por la acción de la TFD, puede generar un rápido agotamiento del ATP intracelular, además de fallos en las rutas apoptóticas, por inactivación o destrucción de enzimas responsables de estos procesos, como las caspasas.^{2,66,120,121}

En los últimos años, se ha destacado a la **autofagia** como un mecanismo de muerte que se puede

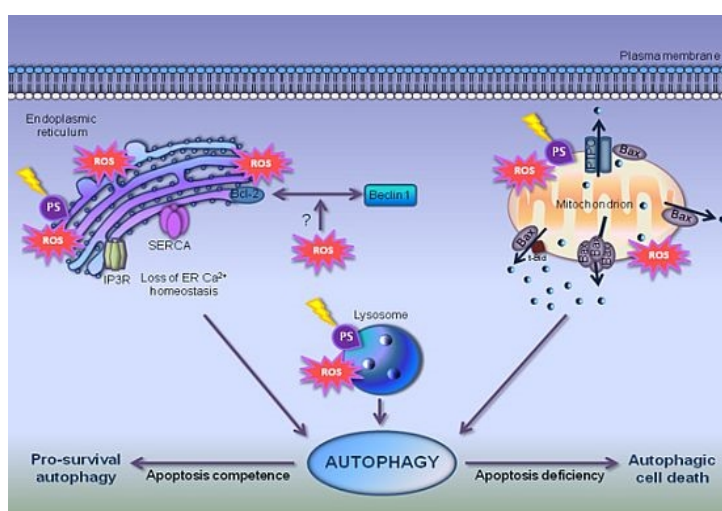


Figura 15. La autofagia puede desencadenarse desde distintos orgánulos en función de la localización del FS (Tomada de Inguscio et al., 2012).

inducir debido al estrés oxidativo generado después de un tratamiento de TFD (ver Fig. 15). Aunque aún no está completamente esclarecido cómo afecta la TFD a este proceso, se ha comprobado que en mamíferos implica una defensa para la destrucción de orgánulos dañados por ROS.^{1,97,122} La autofagia puede ser activada usando FSs que se localizan en los lisosomas (NPe6), RE (hipericina y el porfírico CPO), mitocondrias (m-THPC y BPD-MA), o tanto el RE y las mitocondrias (Pc4).²

A nivel bioquímico, la autofagia se considera dependiente de miembros antiapoptóticos de la familia Bcl-2, con localización en las membranas del RE implicados en la formación del autofagosoma y la regulación de la actividad de Beclina 1.⁹⁷ Las últimas revisiones parecen indicar que podría haber algún tipo de diferencia metabólica entre una autofagia “pro-supervivencia” y otra “pro-muerte”, pero el nivel de solapamiento de estas dos posibles rutas y sus numerosos puntos de relación con las vías apoptóticas, no están todavía esclarecidas.^{60,99}

Es importante resaltar, que en las células tumorales con una apoptosis defectuosa, la autofagia puede ser una alternativa crucial en la sensibilización de las células a la TFD, evitando la resistencia de las células neoplásicas a la muerte celular, lo que incrementa el potencial terapéutico de la TFD.

4. Nuevas estrategias terapéuticas en TFD

La mayoría de las terapias aprobadas para el tratamiento del cáncer, presentan numerosas deficiencias y/o efectos secundarios. Asimismo, aunque la TFD es una modalidad terapéutica aprobada en clínica y cientos de miles de pacientes se sometieron a ella durante las últimas décadas, también posee varias desventajas, incluyendo la no selectividad de los FSs, lo que puede dar lugar a resultados no óptimos y a cierto grado de citotoxicidad en los tejidos sanos, incluyendo la fotosensibilidad cutánea en un cierto plazo.

Debido a esto, se están investigando nuevas estrategias más específicas para la TFD, que incrementen la acumulación selectiva de los FSs y que permitan su rápida eliminación del organismo, una vez concluido el tratamiento.²

El principal reto al que se enfrenta la Oncología (especialmente la quimioterapia sistémica) es, sin duda, el desarrollo de la **resistencia a múltiples drogas** (en inglés **MDR** por *multidrug resistance*) de las neoplasias avanzadas, que limita y finalmente impide, su efecto terapéutico. Las causas de esa resistencia están siendo estudiadas, pero son complejas y multifactoriales por lo que el problema todavía no se ha resuelto completamente (ver Fig. 16).^{123,124}

La reducción en la acumulación intracelular de los fármacos en las células tumorales, es uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia a estos medicamentos. Esto puede producirse por diversas causas, entre otras, su expulsión a través de la membrana plasmática que está relacionada con la actividad de determinadas proteínas transportadoras, principalmente la proteína Pgp (del inglés *P-glycoprotein*) y la proteína Mrp (del inglés *multidrug resistance-associated protein*).

Por otra parte, la célula tumoral puede defenderse de los efectos de la quimioterapia, incluso después de que el medicamento haya alcanzado su objetivo y causado un daño

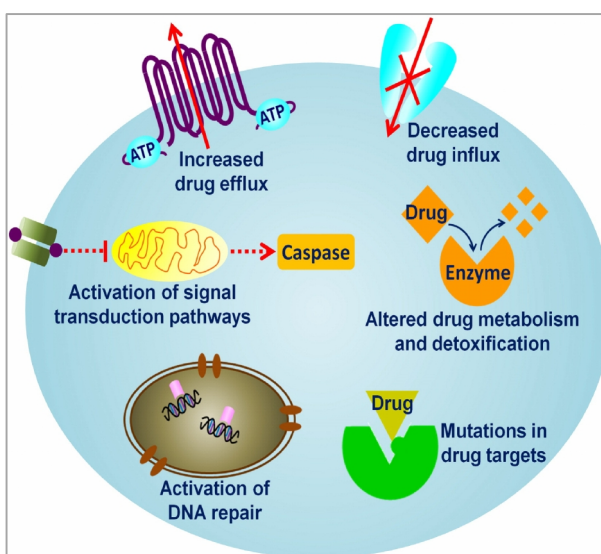


Figura 16. Esquema general de los mecanismos de la resistencia a múltiples drogas (MDR) (Tomada de Yin et al., 2013).

importante. En este sentido, la evasión de la muerte celular programada (apoptosis), es uno de los factores a los que actualmente se le da más importancia como causa de resistencia a múltiples fármacos. El mal funcionamiento de los mecanismos de control del ciclo celular y de la apoptosis en las células neoplásicas, provoca que una célula con daños no reparados en su ADN, prolifere en lugar de morir o detener su división, contribuyendo a la acumulación de errores genéticos.⁵⁵ En resumen, las células neoplásicas son capaces de desencadenar mecanismos biomoleculares que les hacen resistentes a los efectos lesivos de la mayoría de los fármacos oncológicos (ver Fig. 17) y la quimioresistencia, es uno de los mayores retos para alcanzar un tratamiento completamente efectivo del cáncer, lo que requiere el desarrollo de estrategias alternativas capaces de evadir este fenómeno.

La combinación de diferentes modalidades terapéuticas con efectos citotóxicos que no se superpongan, está siendo una de las estrategias utilizadas para mejorar el índice terapéutico de los tratamientos en oncología moderna. Del mismo modo, la combinación de TFD con otras terapias antitumorales más clásicas, también se ha visto que incrementa su efectividad.^{1,125}

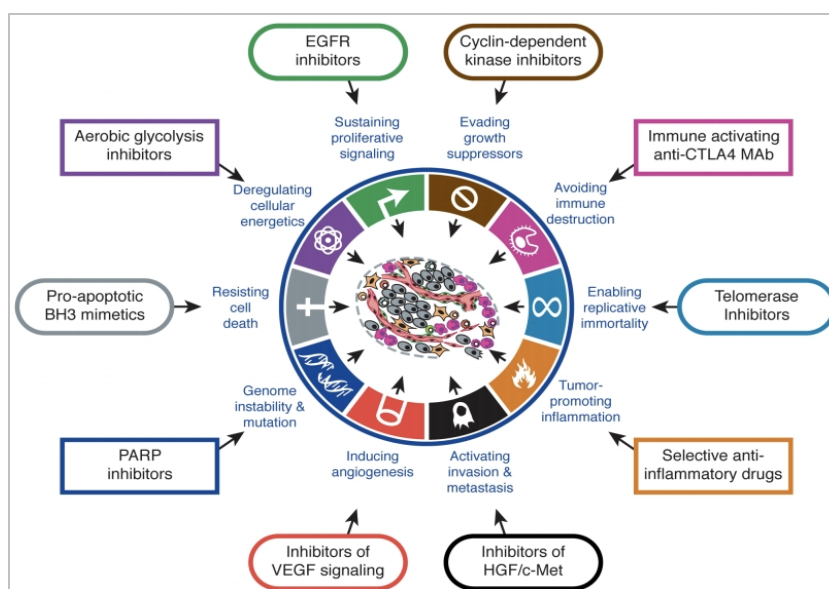


Figura 17. Principales características de una célula tumoral y sus posibles fármacos contra dianas terapéuticas (Tomada de Hanahan *et al.*, 2011).

4.1 Combinación de la TFD con otras terapias antitumorales

En los últimos años, se han propuesto nuevas estrategias que mejoran la selectividad y la especificidad de la TFD contra las células tumorales. La terapia combinada es una modalidad terapéutica muy prometedora para el tratamiento del cáncer, que ha comenzado a usarse como procedimiento habitual y ha generado resultados muy positivos y esperanzadores.

Hay dos enfoques generales que pueden incrementar la eficacia antitumoral de la TFD: **i)** la sensibilización de las células tumorales a los efectos citotóxicos de esta terapia para que sean más susceptibles a los tratamientos sucesivos y, **ii)** la interferencia con las respuestas moleculares citoprotectoras desencadenadas por la TFD en las células tumorales resistentes a terapia.

En este sentido, cabe destacar que la TFD se puede utilizar en combinación, ya sea antes o después, con otras terapias antitumorales más clásicas como, la quimioterapia,¹²⁶⁻¹²⁸ la radioterapia¹²⁹ y la cirugía,¹³⁰ sin comprometer dichas modalidades terapéuticas. Por otra parte, los efectos adversos de la quimioterapia o la radioterapia, están ausentes y teniendo en cuenta que los únicos efectos citotóxicos de la TFD son dependientes del $^1\text{O}_2$ formado, la TFD puede combinarse de forma segura, sin el riesgo de inducir una resistencia cruzada y poner en peligro su actividad antitumoral.^{125,131} Además, la TFD puede repetirse sin comprometer su eficacia.

Los únicos efectos adversos de la TFD se relacionan con el dolor durante algunos protocolos de tratamiento y la fotosensibilización cutánea persistente, que ha sido eludida por los agentes FSs más recientes. Las ventajas de la TFD en comparación con la cirugía, la quimio o la radioterapia se basan en que se reduce la morbilidad a largo plazo, y el hecho de que la TFD no pone en peligro las futuras opciones de tratamiento para los pacientes con enfermedad residual o recurrente.¹³¹

Por último, muchos tratamientos antitumorales convencionales conllevan el riesgo de inducir inmunosupresión. Sin embargo, la TFD está asociada con la inducción de una respuesta inmune antitumoral y el reclutamiento de células inmunes.^{59,132,133}

La **radioterapia** se basa en el uso de radiación ionizante que daña el ADN de las células. Las células tumorales son más susceptibles a la radiación, ya que se dividen más rápidamente y tienen una menor capacidad para reparar daños subletales inducidos en el ADN. La continua acumulación de estas alteraciones conduce a la muerte celular. La radiación no es completamente selectiva, y el daño a tejidos y células sanas es prácticamente inevitable. Para incrementar la selectividad de la radioterapia se ha combinado con tratamientos de TFD, usando como FSs, Photosan®, Photofrin® o el precursor 5-ALA, obteniéndose efectos aditivos o sinérgicos que permiten reducir las dosis de radiación y la disminución de efectos secundarios.^{129,134}

Los **agentes quimioterapéuticos** se pueden dividir en dos grandes categorías de acuerdo con su efecto directo o indirecto sobre el ADN. El grupo de agentes que **daña directamente el ADN** se compone de: **i)** agentes alquilantes, **ii)** antibióticos antitumorales y **iii)** inhibidores de las topoisomerasas.

i) Dentro de los fármacos alquilantes destacan el cisplatino y sus derivados (oxiplatino y carboplatino), cuya eficacia clínica suele estar enmascarada por sus elevados efectos tóxicos adversos, debido a su falta de selectividad hacia los tejidos tumorales.

Varios grupos de investigación han obtenido resultados claramente positivos combinando estos fármacos con TFD. Compagnin *et al.* han demostrado un efecto citotóxico potenciado al combinar Photofrin® con cisplatino en el tratamiento del carcinoma de esófago.¹³⁵ El carboplatino, un análogo menos nefrotóxico que el cisplatino, se ha empleado en combinación con 9-hidroxifeoforbido α (9-HPbD)/TFD o con radaclorina/TFD para tratar cultivos de células humanas de cáncer de cabeza y cuello o de cáncer de tiroides, así como xenoinjertos en ratones desnudos, potenciándose los efectos citotóxicos.¹³⁶⁻¹³⁸ En esta misma línea, el grupo de Rizvi *et al.* ha desarrollado un tratamiento combinando dosis bajas de carboplatino con BPD-MA/TFD (antes o después del tratamiento con carboplatino) en un modelo 3D de cáncer de ovario metastásico, caracterizado por su elevada quimioresistencia. El tratamiento con BPD-MA/TFD antes del agente quimioterapéutico, produjo un efecto sinérgico en relación a la reducción del volumen del tumor. Este sinergismo no fue detectado

cuando se aplicó dicho tratamiento en el orden inverso.¹²⁶ En resumen, la asociación de cisplatino (o sus derivados) con la TFD puede resultar en sinergia, lo que permite disminuir la dosis del fármaco antineoplásico tóxico, sin reducir la eficacia terapéutica global.

ii) Dentro de los antibióticos antitumorales, destaca la doxorubicina (DOX), que además de ser un agente intercalante del ADN es un inhibidor de la topoisomerasa II. En 1997, el grupo de Casas y col. analizó la interacción de un tratamiento de TFD (5-ALA) combinado con DOX, en ratones portadores de un adenocarcinoma de mama. La inhibición del crecimiento del tumor mejoró significativamente por el tratamiento combinado. El efecto de la DOX se ha analizado también en combinación con otros FSs como el Foscan® o la AIS2Pc.¹³¹ Por último, la eficacia antitumoral de la DOX en combinación con azul de metileno/TFD ha sido investigada en un modelo tumoral murino resistente a fármacos.¹²⁷ En este caso, la novedad adicional fue proporcionada por el uso de nanopartículas (NPs) para la entrega sincronizada de los dos fármacos. El empleo de NPs dio lugar tanto a, una mayor acumulación de ambos medicamentos en el tumor, una inhibición significativa de la proliferación celular y un incremento de la inducción de la apoptosis. Otro antibiótico algo menos utilizado es la mitomicina C, que inhibe la síntesis de ADN. Cabe destacar un ensayo clínico en fase 1 realizado en pacientes con cáncer de vejiga superficial recurrente, que demostró el potencial de la combinación de mitomicina C con 5-ALA/TFD.¹³⁹

iii) En los últimos años, los inhibidores de las topoisomerasas (I y II), han sido reconocidos como fármacos para la quimioterapia del cáncer ya que en su función, interfieren con el ciclo celular, causan roturas en el ADN, deterioran la integridad del genoma y, finalmente, inducen la muerte celular. Un potente inhibidor de la topoisomerasa I es la camptotecina, un alcaloide quinolina, que induce una elevada toxicidad en el organismo. El topotecan y el irinotecan -dos análogos de la camptotecina- han sido introducidos en oncología ya que presentan una toxicidad sistémica más reducida. Aunque ninguno de estos compuestos se ha usado como tal en combinación con TFD, Peng *et al.* han sintetizado micelas que incorporan clorina y un metabolito activo del irinotecan, obteniendo resultados muy prometedores tanto *in vitro* como *in vivo*.¹⁴⁰ Dentro de los inhibidores de la topoisomerasa II, destaca el etopósido, también conocido como VP-16, una podofilina semisintética derivada de la planta *Podophyllum notatum*. El uso de este fármaco con TFD fue propuesto por Gantchev *et al.* en 1996.¹⁴¹ Los autores compararon los efectos citotóxicos de los tratamientos individuales y combinados con etopósido y TFD con tetrasulfonato de ftalocianina de aluminio (AIPcS4), en células de leucemia humana. Esta combinación resultó muy eficaz, detectándose una fuerte inhibición del crecimiento celular, detención del ciclo celular y fragmentación del ADN.

Dentro del grupo de agentes quimioterapéuticos que **indirectamente dañan el ADN**, se encuentran análogos de bases o inhibidores de las actividades enzimáticas necesarias para llevar a cabo la síntesis de ADN. En cuanto a los análogos de bases de ADN, hay investigaciones que combinan gemcitabina con TFD (con Photofrin® o Photosan®).^{142,143} El metotrexato, un inhibidor de la síntesis de ADN que interfiere con la síntesis de nucleótidos de purina, es un análogo estructural del ácido fólico y un potente inhibidor de la dihidrofolato reductasa, que se ha empleado con frecuencia en una combinación con 5-ALA/TFD. Esta combinación se ha demostrado que causa un efecto citotóxico sinérgico en células de carcinoma de próstata humano¹⁴⁴ y en modelos de carcinoma de células escamosas tanto *in vitro* como *in vivo*.¹⁴⁵ Curiosamente, la respuesta diferencial y selectiva se basa en

que el metotrexato induce la expresión de la coproporfirinógeno oxidasa mitocondrial (la principal enzima en la síntesis de la PpIX), que está particularmente sobreexpresada en células tumorales. La producción adicional de PpIX permite que la dosis de metotrexato pueda disminuirse, resultando menos tóxico y sin embargo, hace la TFD más eficaz, debido al aumento en la producción de PpIX.

Muchos fármacos quimioterapéuticos tienen como diana el citoesqueleto, con el objetivo de inhibir la progresión del ciclo celular. Los agentes antimitóticos más utilizados en la terapia del cáncer incluyen: los alcaloides de la vinca (aminas producidas por la planta *Catharanthus roseus*) y los taxoides (terpenos producidos por plantas del género *Taxus*). Dentro del grupo de los alcaloides encontramos, la vincristina, la vinblastina y la vinorelbina, que inhiben la despolimerización de los microtúbulos. Algunos ejemplos de taxoides son el paclitaxel y el docetaxel, utilizados para tratar, el cáncer de pulmón, de ovario y de mama. Su mecanismo de acción reside en la estabilización de los microtúbulos. Estos fármacos se han empleado en varios sistemas experimentales en combinación con TFD, con resultados satisfactorios ya que se disminuye la resistencia de las células tumorales a la terapia.¹³¹

Una terapia antitumoral “ideal” debería destruir el tumor primario y activar el sistema inmune para así reconocer y eliminar las células tumorales residuales, tanto en el foco del tumor primario como si se ha producido metástasis. Si esto no ocurre, las células cancerosas escapan al control inmunológico dando lugar a neoplasias recurrentes.¹⁴⁶ La combinación de TFD con **inmunoterapia** debe estar dirigida a mantener y amplificar la respuesta del sistema inmune contra las células tumorales.¹³³ Con este fin, se han desarrollado varias estrategias basadas en la inflamación localizada que se puede inducir después de un tratamiento de TFD o mediante el uso de factores que potencian el reclutamiento de macrófagos o neutrófilos o la inducción de citoquinas. La fotoinmunoterapia se basa en el uso de FSs conjugados con anticuerpos monoclonales o sus fragmentos, que son específicos frente a determinados antígenos expuestos en las células tumorales (más información en el apartado 4.2). Recientemente se ha publicado que la combinación de, TFD (con **Foscan**®), inmunoterapia (con linfocitos de ratones pretratados con TFD) y bajas dosis de quimioterapia (con el alcaloide vegetal Navelbine® que afecta a los MTs, o con cisplatino), induce en modelos murinos la regresión completa de tumores avanzados.¹⁴⁷

La TFD también se ha asociado con enfoques terapéuticos más innovadores para el tratamiento del cáncer, incluyendo la combinación con supresores o inhibidores tumorales,¹⁴⁸⁻¹⁵¹ fármacos antiangiogénicos^{54,152} o terapia génica.¹⁵³

Dado que la **angiogénesis** promueve el crecimiento y la progresión tumoral, su inhibición se ha propuesto como una estrategia potencialmente eficaz contra el cáncer. La TFD puede inducir daño vascular directo y posteriormente, una lesión más extensa debido a la hipoxia que se origina a partir de la obstrucción vascular. La combinación de TFD con compuestos que interfieren con factores angiogénicos como VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular, del inglés *vascular endothelial growth factor*) y/o la ciclooxigenasa 2 (COX-2), o sus receptores, parece constituir un enfoque terapéutico adecuado.¹³¹ Varios autores han observado que la mayor eficacia de la TFD en asociación con inhibidores de la COX-2, era debida al profundo daño en los vasos sanguíneos inducido por la TFD, acompañado por la inhibición simultánea de la neoangiogénesis. El grupo de Makowski *et al.*, consiguió la regresión completa de tumores murinos cuando diversos inhibidores se administraron después de la TFD con Photofrin®.¹⁵⁴ También, Ferrario *et al.* obtuvieron mejoras en la respuesta a Photofrin®/TFD

combinándola con celecoxib (un inhibidor de COX-2). Además, dicho grupo ha demostrado que el 2,5-dimetil celecoxib, un análogo estructural del celecoxib sin actividad inhibidora de COX-2, puede imitar los efectos antitumorales logrados con celecoxib, disminuyendo sus efectos secundarios.¹⁵⁰ Por otra parte, el ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético (DMXAA) es un agente que actualmente se está evaluando en fase clínica, ya que causa selectivamente el colapso de la vasculatura tumoral provocando muerte celular y alterando la permeabilidad vascular tumoral directa e indirectamente, a través de la inducción de diversos mediadores vasoactivos, tales como TNF- α . Se ha demostrado que bajas dosis de DMXAA administradas antes de un protocolo de TFD, mejoran la actividad del Photofrin® o Photochlor®/TFD en el tratamiento de tumores murinos.¹⁵⁵

Otras estrategias encaminadas a incrementar la eficacia de la TFD, han sido dirigidas al bloqueo de diferentes **receptores de hormonas** o de **factores de crecimiento**. El tamoxifeno ha sido utilizado con éxito en combinación con Photofrin®/TFD en células de glioma humano *in vitro*.¹⁵⁶ En este sentido, resulta más interesante el caso del hidroxitamoxifeno, un metabolito natural del tamoxifeno, que ha sido químicamente ligado a un derivado de porfirina (pirofeofóbido), incrementando la selectividad de la terapia combinada.¹⁵⁷

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (en inglés EGFR por *epidermal growth factor receptor*) está sobreexpresado en muchos tipos de tumores y está considerado como un objetivo muy prometedor para la terapia del cáncer. Erbitux® (cetuximab), un anticuerpo monoclonal que se une competitivamente a EGFR, inhibe su dimerización, reduce la proliferación celular y previene la metástasis y el crecimiento del tumor. Varios autores han descrito la combinación de inhibidores de EGFR y TFD. Por ejemplo, el efecto antitumoral de Erbitux® en combinación con hipericina/TFD se ha estudiado en modelos de xenoinjertos de carcinoma de vejiga.⁵⁴ En este trabajo, los autores concluyen que la inhibición de la expresión de EGFR en combinación con los efectos de la TFD, induce apoptosis y por lo tanto, una eficaz regresión tumoral. La combinación de BPD-MA/TFD con Erbitux®, es otro ejemplo de asociación terapéutica descrita para el tratamiento del cáncer de ovario, tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*.¹⁵⁸ Los autores describen que la terapia combinada reduce significativamente el crecimiento y el tamaño del tumor. Además, la supervivencia de los animales aumentó en comparación con la monoterapia, promoviendo este protocolo como un enfoque alternativo para el tratamiento del cáncer de ovario humano.

Por otra parte, se ha propuesto que la **inhibición del proteasoma** puede afectar a la progresión del cáncer ya que, cuando se detiene la degradación de proteínas, el efecto se aprecia particularmente por las células que proliferan rápidamente. Diversos estudios han demostrado que la combinación de Photofrin® o Foscan®/TFD con inhibidores del proteasoma (como bortezomib o el ácido acetilsalicílico) potencia de forma sinérgica el efecto terapéutico global.^{159,160}

Asimismo, varias sustancias de **origen natural** se han utilizado en combinación con TFD. Por ejemplo la curcumina, que es un colorante natural procedente de la cúrcuma al que se le han descrito propiedades antitumorales. En un reciente estudio, Ahn *et al.* han demostrado que la combinación de curcumina con Photofrin®/TFD potencia la inducción de apoptosis en células tumorales humanas de cáncer de cabeza y cuello.¹⁶¹

Por último, destacar una nueva estrategia combinada con prometedores resultados para el tratamiento de diversos tipos de cánceres. Consiste en la **combinación de dos FSs** con distinta diana terapéutica y distinto mecanismo de acción, administrados en un único régimen de tratamiento, lo que conlleva a una fotoinactivación de las células neoplásicas, con efecto sinérgico, empleando dosis mínimas de TFD. De esta manera se puede alcanzar un doble objetivo: incrementar la eficacia de la TFD, disminuyendo los posibles efectos secundarios no deseados.^{113,116,162,163} Esta opción terapéutica ha sido extensamente estudiada en nuestro laboratorio y es el tema principal de esta Tesis Doctoral.

4.2 Nuevos sistemas de transporte de los FSs para TFD

En función de su estructura química, los FSs se pueden dividir en dos tipos: hidrofílicos e hidrofóbicos. Los hidrofílicos al disolverse en medios acuosos (tales como tampones o medios de cultivo) resultan fáciles de administrar. Sin embargo, muchos FSs son hidrofóbicos, por lo que al disolverlos en medios acuosos, presentan fuertes interacciones entre sus moléculas, lo que altera sus propiedades fotofísicas (menor producción de $^1\text{O}_2$), químicas (menor o nula solubilidad) y biológicas (menor capacidad de penetración en las células). Para solucionar estos problemas, la Nanomedicina proporciona una vía muy prometedora para alcanzar un mejor control de la biodistribución de los FSs y su entrega selectiva en el tumor. De este modo, se han desarrollado numerosos sistemas de vehiculización que aportan diversas ventajas, como la capacidad de transportar mayores cantidades de FS sin alterar su actividad, evitando su degradación o eliminación prematura de la circulación sanguínea y facilitando la acumulación selectiva en el tejido diana o la interacción del FS con las células.^{28,36,164}

En los últimos años, los avances en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que incluyen la TFD dirigida a las células tumorales han aumentado considerablemente. Los mecanismos por los cuales el FS se acumula preferentemente en las zonas tumorales no están completamente esclarecidos. Diversas investigaciones han demostrado que la mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos tumorales, junto con el escaso drenaje linfático del tumor, conducen a que el FS se retenga en mayor cantidad en el tejido tumoral (ver Fig. 18), por el denominado efecto EPR (del inglés *Enhanced Permeability and Retention Effect*) de la “**vectorización**” pasiva.^{165,166}

Además, se están realizando numerosos esfuerzos y proponiendo nuevas estrategias para mejorar y ampliar la TFD a diversos campos de la Medicina. En los últimos años se están investigando los denominados: “FSs de tercera generación”, donde se incluyen los FSs de 2ª generación comentados anteriormente ligados a NPs de distinta naturaleza y con distintos recubrimientos. Además, estas NPs se pueden conjugar con péptidos o anticuerpos monoclonales, para incrementar la especificidad y la acumulación de los FSs en el tejido tumoral mediante la denominada “**vectorización**” activa (ver Fig. 18).^{165–167}

Dentro de las estrategias de vehiculización más empleadas, destaca la conjugación de los FSs con anticuerpos monoclonales específicos contra las células tumorales o su incorporación a NPs modificadas con ligandos que tengan afinidad por las células neoplásicas. De este modo, la TFD se está combinando cada vez más con la Nanotecnología, para tratar de conseguir la máxima acumulación del FS con la mayor especificidad posible en el área tumoral. Los datos obtenidos hasta ahora, sobre la evaluación de los FSs de 3ª generación, parecen muy prometedores aunque se encuentran solamente en las primeras etapas de desarrollo y evaluación.^{25,164,168} La mayoría de los informes publicados en esta área, se

centran en estudios *in vitro*, probablemente debido a los grandes retos y la enorme variabilidad que suponen los estudios *in vivo*.¹⁶⁴

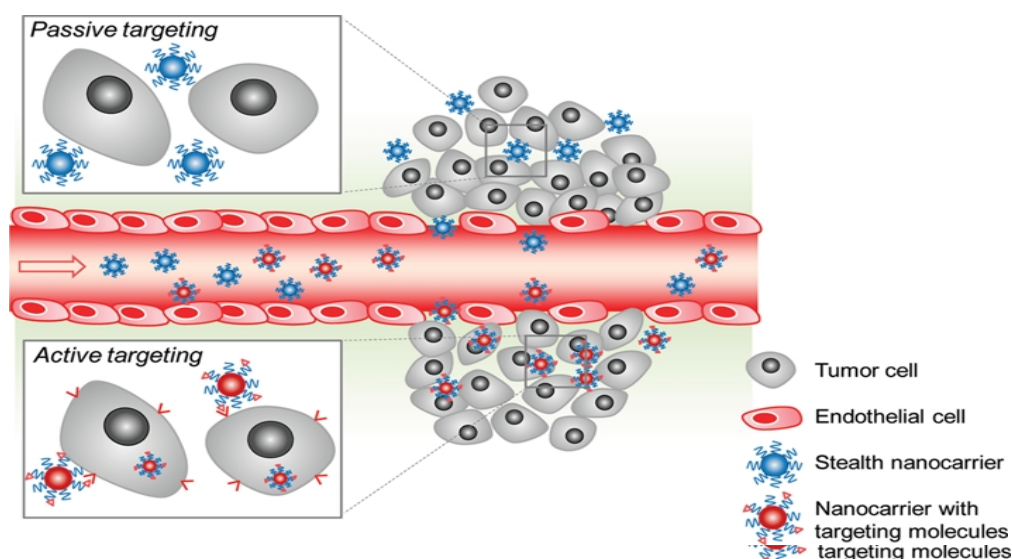


Figura 18. Tipos de vectorización de fármacos antitumorales (Tomada de Gullotti et al., 2009).

Varios FSs (por ejemplo, AIPcS4, *m*-THPC, feofórbido a, clorina e6, BPD-MA) ligados a anticuerpos monoclonales específicos de tumores (por ejemplo, C225, U36, E48, HER50, HER66) han sido utilizados en fotoinmunoterapia, aunque los protocolos finales aún no están completamente definidos. Además, existen varios inconvenientes, ya que hay importantes problemas asociados con el acoplamiento químico, la reducción de la fototoxicidad de los complejos y su penetración limitada en los tumores pobremente vascularizados.

Ferrario y Gomer han investigado el efecto del **Avastin®** (bevacizumab), un anticuerpo monoclonal antiangiogénico (inhibe a VEGF) que está aprobado para el tratamiento del cáncer de colon y recto, en combinación con Photofrin®/TFD.¹⁶⁹ Avastin® se administró a ratones portadores de tumores inmediatamente después de la irradiación. Los resultados obtenidos mostraron una inhibición del crecimiento del tumor a largo plazo en comparación a los tratamientos individuales. Sin embargo, en noviembre de 2011 tanto la FDA como la EMA, pusieron en duda el efecto de Avastin® para el tratamiento del cáncer de mama metastásico, ya que si bien, no curaba este tipo de cáncer, mejoraba su pronóstico, pero a cambio de importantes efectos secundarios. Aún así, se sigue utilizando para el tratamiento de otros tipos de tumores y en la Unión Europea está permitido su uso para el tratamiento del cáncer de mama en combinación con paclitaxel. Asimismo, la combinación de Photofrin®/TFD con los **anticuerpos monoclonales antiangiogénicos MF1 y DC101** dirigidos contra **VEGFR-1 y VEGFR-2**, fue particularmente eficaz en la reducción del tamaño del tumor y en la prolongación del tiempo de supervivencia de ratones desnudos portadores de un glioblastoma.¹⁷⁰

Otra de las técnicas más utilizadas para vehiculizar los FSs es su incorporación en **liposomas**, unas pequeñas vesículas artificiales formadas por una bicapa lipídica con un tamaño entre 20 y 1000 nm (ver Fig. 19). Los liposomas permiten introducir en su interior tanto FSs hidrofílicos, que quedan en el espacio interno acuoso del liposoma, como hidrofóbicos, que se incluyen en la bicapa lipídica de la vesícula. De este modo los FSs se mantienen en estado monomérico, evitando su agregación, mejorando su rendimiento fotodinámico y su aplicación clínica. Los liposomas se acumulan preferentemente en las células tumorales, debido a que éstas sobreexpresan receptores de membrana que reconocen los liposomas. Entre estos receptores destacan los receptores para las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que se encuentran en altas cantidades en la superficie de las células tumorales, dado que por su elevada tasa de proliferación necesitan un gran aporte de colesterol para sintetizar sus membranas.^{28,171–173}

Por el contrario, los FSs hidrofílicos, son transportados por la albúmina del suero después de una administración intravenosa.^{24,172}

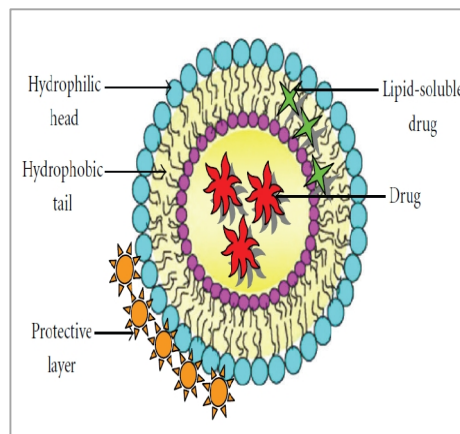


Figura 19. Esquema de un liposoma de fosfolípidos (Tomada de J. Nanomaterials. Article ID 164506, 2011).

Entre las principales ventajas de los liposomas destacan: su biocompatibilidad y que su tamaño, carga y propiedades superficiales son fácilmente modificables, lo que permite dirigir fármacos contra células concretas, e incluso, compartimentos celulares específicos.^{28,36} Una forma de modificar las propiedades de los liposomas para la TFD, es su conjugación con diversos ligandos de membrana, como por ejemplo: anticuerpos como el trastuzumab (comercializado bajo el nombre de Herceptin®), el folato, la transferrina, o diversos péptidos, entre otros compuestos.^{2,125,174–177}

Asimismo, la modificación de la superficie de los liposomas con polietilenglicol (PEG), es una estrategia muy extendida, ya que este polímero hidrofílico biodegradable prolonga la vida media de los FSs en el torrente sanguíneo a la vez que disminuye su interacción con el sistema inmune.^{178–180} Por lo tanto, los liposomas constituyen una herramienta muy versátil y con un gran potencial para la vehiculización de moléculas terapéuticas.

Finalmente, otra estrategia para dirigir los FSs consiste en su incorporación en **nanopartículas (NPs)**. En los últimos años, se ha producido una expansión sin precedentes en el campo de la Nanomedicina, en el desarrollo de nuevas NPs para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer.

Las NPs poseen propiedades biológicas únicas, ya que su pequeño tamaño y su gran relación superficie-volumen, les permite transportar fármacos y/o FSs (hidrófilos e hidrófobos) con elevada eficiencia, lo que les hace sumamente atractivas en el campo de la Oncología (Fig. 20). Además, las NPs pueden usarse como agentes para la obtención de imágenes que permitan detectar y vigilar la progresión del cáncer.¹⁸¹ Las NPs se definen como partículas coloidales con un tamaño inferior a 100 nm, aunque los liposomas, de diámetros superiores, están también aceptados como un tipo de nanopartícula. Las NPs se utilizan en ensayos histológicos y de diagnóstico, así como sistemas de administración de fármacos.¹⁶⁴ El uso de nanomateriales como vehículos de FSs está suponiendo un gran avance para la TFD, porque estas NPs pueden satisfacer prácticamente todos los requisitos de un

FS “ideal”. La superficie de las NPs puede modificarse para crear grupos funcionales con una gran variedad de propiedades bioquímicas. Se puede cambiar su composición para evitar la degradación enzimática, protegiendo así al FS de los ataques enzimáticos. También pueden fabricarse NPs resistentes a ataques microbianos, y su tamaño de poro puede adaptarse a tamaños específicos para permitir la liberación de los FSs. Debido a su reducido tamaño pueden penetrar profundamente en los tejidos a través de capilares y son capaces de circular entre las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos, lo que puede generar un mejor acceso del FS al tumor. Además, se diseñan NPs que sean fácilmente biodegradables y que no generen respuestas inmunológicas no deseadas. Pueden ser transparentes para que no influyan con la actividad del FS y ser más fotoestables que los colorantes orgánicos para aplicaciones *in vivo*.^{168,182}

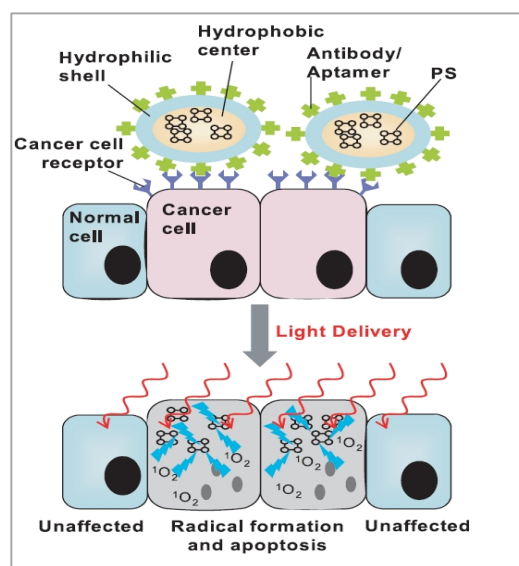


Figura 20. Esquema de la vectorización activa de FSs mediada por NPs funcionalizadas (Tomada de Verma *et al.*, 2007).

Las NPs en TFD pueden llegar a actuar como plataformas multifuncionales proporcionando: un volumen en el cual el FS es encapsulado o acoplado, un lugar de unión de grupos de orientación y una superficie hidrófila, hidrófoba o anfifílica dependiendo de sus lugares de transporte y destino. Además se han sintetizado NPs metálicas que mejoran los rendimientos cuánticos en la generación de oxígeno singlete.^{168,183}

En relación con la Nanotecnología, cabe destacar también la asociación de la TFD con la hipertermia (una terapia antitumoral basada en el calor generado cuando NPs superparamagnéticas, como las NPs de óxido de hierro, son expuestas a campos magnéticos alternos). Este nuevo enfoque resulta muy interesante ya que ambos tratamientos se complementan. Las células tumorales oxigenadas mueren preferentemente por TFD, mientras que las células hipóxicas lo hacen por hipertermia.^{184–187}

Por lo tanto, además de las ventajas de los liposomas en el campo de la TFD, este tipo de sistema de administración de fármacos también podría ser utilizado para vehiculizar agentes de hipertermia asociados con FSs, un nuevo enfoque con un gran potencial para mejorar las tasas de inactivación de las células tumorales.

Además de todos los tipos de vehiculizadores descritos anteriormente, se han desarrollado otros sistemas administradores de fármacos como las micelas, los dendrímeros, las NPs de ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA), las NPs de oro o de poliacrilamida, entre otras, que se han combinado con los principales tipos de FSs: porfirinas, clorinas o ftalocianinas, así como con la hipericina, el azul de metileno o la indocianina verde.

Con todo lo explicado anteriormente, es evidente que las NPs son una gran promesa para el futuro desarrollo de la TFD y proporcionan, por multitud de vías, un mecanismo muy eficaz de distribución de diferentes tipos de FSs, tanto a través de la vectorización pasiva como activa; ya que pueden potenciar

la acumulación selectiva de los FSs en los tejidos tumorales, incrementando la eficacia de la TFD, minimizando simultáneamente los efectos secundarios.

5. Cultivos celulares en tres dimensiones (3D)

Para tener éxito en el desarrollo de nuevos fármacos, resulta imprescindible el empleo de sistemas celulares que reproduzcan con precisión el fenotipo del tejido diana. De este modo, se pueden obtener datos biomédicos fiables que posteriormente se correlacionan con los ensayos *in vivo*. Tradicionalmente, los ensayos preclínicos han dependido de sistemas celulares en dos dimensiones (2D) y de modelos animales. Los cultivos en 2D proporcionan una información muy valiosa en la comprensión de las respuestas celulares inducidas después de diversos tratamientos. Sin embargo, en estos sistemas las células crecen en condiciones fisiológicamente restringidas ya que al estar adheridas a sustratos rígidos y planos, se incrementa la superficie expuesta a los medios de cultivo (ver Fig. 21). Además, se reducen las interacciones célula-célula y célula-MEC.^{188,189} En el extremo opuesto, los modelos animales muestran las respuestas integradas que resultan de las interacciones complejas entre tejidos y órganos. Sin embargo, no logran captar las facetas clave de la respuesta humana, son muy costosos, se debe invertir mucho tiempo en su análisis y éticamente generan controversia.^{188,190} Por ello, existe un creciente interés en el desarrollo de modelos que reproduzcan la complejidad de los tejidos humanos, mientras que conservan la capacidad para el estudio a gran escala y el análisis de imagen a nivel celular.

En este aspecto, los sistemas celulares tridimensionales (3D) son particularmente atractivos y útiles, ya que integran señales químicas y mecánicas procedentes de la MEC y de las células adyacentes (Fig. 21). Es importante destacar que los modelos 3D pueden imitar el patrón de expresión génica y los gradientes moleculares de los sistemas *in vivo*.

Es importante recordar que las células del organismo crecen dentro de una red organizada en 3D. Las interacciones célula-célula y célula-MEC regulan la proliferación, diferenciación, muerte o invasión.^{4,189} Los modelos 3D proporcionan esa tercera dimensión, esencial para integrar las señales mecánicas y químicas, imitando el microambiente *in vivo*.

Por otra parte, los tejidos experimentan fenómenos de transferencia de masa para cualquier agente soluble. Este fenómeno se intensifica en los tumores, ya que presentan una abundante y densa MEC, junto con una red vascular primitiva (neovasculatura). En primer lugar, este complejo microambiente tumoral es inducido por una elevada deposición y remodelación de los componentes de la MEC (colágeno, ácido hialurónico, etc.) por parte de las células tumorales y los fibroblastos del estroma. En segundo lugar, la red vascular tumoral está desestructurada, debido al desequilibrio entre

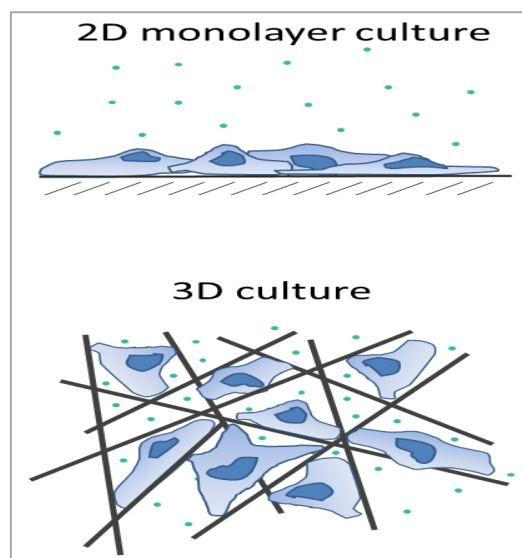


Figura 21. Esquema de cultivos 2D y 3D. (Tomada de <http://www.electrospinning.co.uk/regenerative-medicine/>).

los factores pro- y anti-angiogénicos y el estrés generado por la tasa de proliferación incontrolada. Estos dos fenómenos, convergen en una entrega ineficiente de los medicamentos y del oxígeno (hipoxia), que puede afectar significativamente la eficacia de la TFD. Experimentalmente, los cultivos 2D convencionales se caracterizan por una rica y uniforme oxigenación y nutrición. En cambio, los cultivos 3D pueden capturar estas limitaciones de transferencia de masa y, por lo tanto, predecir mejor el resultado de terapias dependientes de oxígeno o de distribución de fármacos (Tabla 4).^{29,191}

Tabla 4. Comparación de las características de cultivos 2D, 3D y animales (Tomada de Alemany-Ribes *et al.*, 2013).

	2D cell cultures	3D cell cultures	Animals
Tissue Architecture	Cells are unnaturally polarized and mainly exposed to culture medium and rigid substrates	Cells interact with ECM and adjacent cells in 3D. They secrete and remodel ECM	Integrated response from interactions among all tissues and organs
Gene expression pattern	Physiological tumor properties are constricted in 2D and, thus, expression patterns	Key expression pattern in tumor biology is recreated (apoptosis resistance, etc.)	Human responses are not accurately captured (drug toxicity, metabolism, etc.)
Molecular gradients	Cells are submitted to uniformly rich oxygenation and drug accessibility	Oxygen and drug delivery is controlled by simple diffusion	Vascularization regulates oxygen and drug delivery, together with drug clearance
Drug discovery applicability	Inexpensive and simple to apply for high-throughput screening	More realistic drug response than 2D. Easier to apply than animal models	Expensive, time-consuming, poor cell-level imaging and ethically controversial

La morfología y la fisiología de las células tumorales dependen fuertemente del microambiente tumoral. En particular, su agresividad se ve reforzada por las señales que provienen tanto de la MEC, como de las células adyacentes. Por ejemplo, la comunicación entre las células quiescentes e hipóxicas situadas en el núcleo interno del tumor y las células altamente proliferativas de la superficie, promueve la transmisión de factores de crecimiento que están implicados en la supervivencia celular, la resistencia a la apoptosis o la reprogramación metabólica. Además, las células hipóxicas pueden hacer frente a un entorno metabólicamente hostil que proporciona una presión selectiva para favorecer la supervivencia de las células cancerosas más transformadas, agresivas y genéticamente inestables. Como resultado, estas condiciones de crecimiento afectan significativamente a los perfiles de expresión de ARN y proteínas y, por lo tanto, a la respuesta celular a las terapias, incluyendo la adquisición de resistencia a los medicamentos. Experimentalmente, los cultivos 2D representan un modelo reduccionista sobre la base de una simple colección de células tumorales relativamente homogéneas. En cambio, los cultivos 3D restablecen las propiedades morfológicas y fisiológicas del tumor, imitando la resistencia multicelular a fármacos inductores de la muerte celular y permitiendo así mejorar su poder predictivo para el diseño de fármacos.²⁹

Los sistemas de células 3D disponibles en la actualidad incluyen explantes de tejido, esferoides, cultivos basados en andamios proteicos, órganos perfundidos y biorreactores de fibra hueca.

Hasta la fecha, los modelos 3D más populares para la investigación preclínica son los esferoides celulares, que consisten en grupos compactos de células basados en la tendencia natural que poseen muchos tipos celulares para formar agregados. Las células se cultivan hasta que forman agregados de entre 450-500 μm de diámetro. Estas dimensiones imitan las limitaciones del transporte de masas que ocurren *in vivo*, ya que normalmente la difusión simple sólo permite la penetración de oxígeno y de

fármacos unas 150-250 μm .^{190,192} En consecuencia, los esferoides presentan en la zona superficial regiones con elevada tasa de proliferación celular y en el interior células quiescentes debido a las limitaciones del transporte de nutrientes y oxígeno. Por lo tanto, estos sistemas recrean muchos de los aspectos de la fisiopatología de los tejidos tumorales humanos (Fig. 22).

Sutherland *et al.* fueron los pioneros en el uso de **esferoides** para la investigación del cáncer.^{193,194} Sin embargo, estos sistemas están limitados por su lenta agregación espontánea y la imposibilidad para controlar su tamaño y forma final.

Sin embargo, los cultivos basados en **andamios proteicos** están siendo considerados como una buena alternativa a los esferoides. Presentan dos ventajas fundamentales en comparación con los esferoides. En primer lugar, los andamios pueden ser diseñados en función del tejido tumoral que se vaya a investigar. En segundo lugar, la arquitectura y las dimensiones del andamio pueden ser diseñadas con precisión, controlándose la distribución de los fármacos y el oxígeno.¹⁹⁰ Según su origen, pueden ser clasificados como materiales naturales o sintéticos. Los andamios naturales se extraen de animales y los más utilizados para el cultivo celular son el colágeno y el MatrigelTM. El colágeno es una de las principales proteínas de la MEC, y el MatrigelTM consiste en una matriz de componentes de la membrana basal solubilizada (laminina, colágeno IV, entactina, heparán sulfato, factores de crecimiento, etc.) extraída de células de sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm de ratón.^{195,196} En estudios pioneros, Bissell *et al.* establecieron un modelo de cáncer de mama en 3D en el que las células epiteliales de mama normales y tumorales fueron cultivadas en MatrigelTM.¹⁹⁷ Estos autores observaron que las células tumorales mantenían su fenotipo invasivo y formaban colonias desorganizadas, mientras que las células normales estaban diferenciadas en acinos que se asemejaban a los tejidos de mama original.

Las ventajas de los andamios proteicos naturales son su biocompatibilidad, accesibilidad y la capacidad de proporcionar todo el espectro de señales químicas y físicas que se necesitan para inducir la morfogénesis y la funcionalidad de muchos tipos celulares. Sin embargo, la diversidad de estas señales, podría ser una desventaja cuando se trata de aislar los efectos de algunos factores específicos. Por otra parte, la misma MEC puede tener una composición y unas propiedades mecánicas muy variables en función de su origen y lote específico, lo que conlleva a una reducción de la fiabilidad y reproducibilidad de los ensayos.^{4,190,195}

Para evitar estos inconvenientes, se han desarrollado **andamios sintéticos** que pueden ser adaptados para imitar las propiedades específicas de la MEC, proporcionando entornos celulares reproducibles.¹⁹⁰

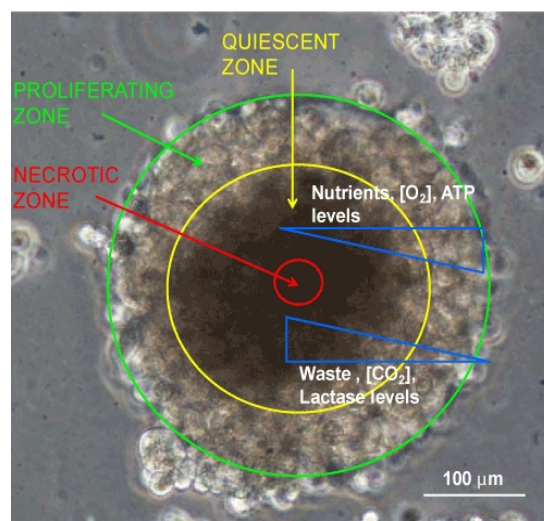


Figura 22. Gradientes patofisiológicos en un esferoide. (Tomada de <http://www.omicsonline.org/2155-9538/2155-9538-2-e109.php?aid=9306>).

Paradójicamente, esta ventaja hace que esta clase de biomateriales sean más complejos debido a una amplia gama de factores que tienen que ser recreados con precisión, incluyendo la porosidad, la rigidez, los puntos de adhesión celular y los factores de crecimiento.

Otro grado de complejidad que se puede incorporar a los modelos 3D es la vascularización. Con este fin, se han desarrollado diferentes estrategias, incluyendo el co-cultivo con células endoteliales que son estimuladas por la entrega de factores angiogénicos como el VEGF.^{198,199}

Por todo lo explicado anteriormente, la investigación de la TFD está incorporando paulatinamente, el empleo de esta tercera dimensión (ver Fig. 23). De esta forma, se garantizará un diseño más adecuado en función del tejido que se vaya a tratar.

Obviamente, la aplicación de los modelos 3D se ha convertido en una herramienta fundamental en los procesos de selección de nuevos fármacos (no sólo FSs), para predecir con mayor precisión los ensayos de las nuevas terapia antitumorales.

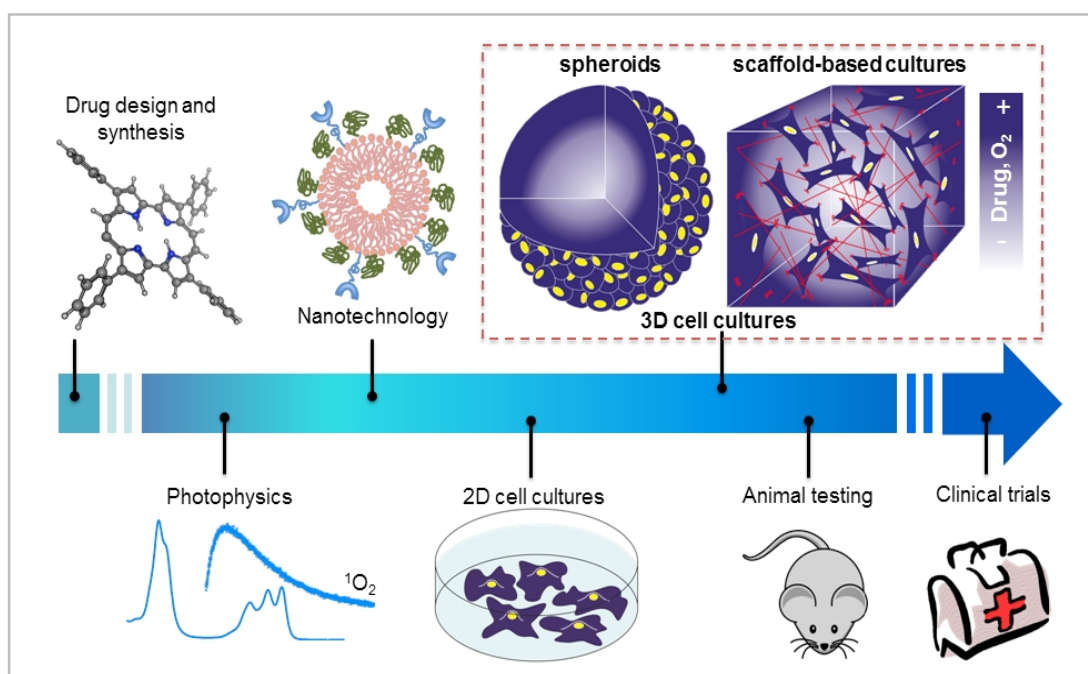


Figura 23. Metodología para el desarrollo de nuevos fármacos en TFD (Tomada de Alemany-Ribes et al., 2013).

NOTA EXPLICATIVA: Por una cuestión de claridad, y debido al elevado número de Figuras y Tablas incluidas en la presente Tesis Doctoral, la numeración de las mismas sigue un orden correlativo sólo dentro de cada sección del presente trabajo. Comenzando la numeración de nuevo en 1, cuando se cambia de sección / apartado.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

*“El experimentador que no sabe lo que está buscando
no comprenderá lo que encuentra”*
Claude Bernard (1813-1878)



Teniendo en cuenta la gran cantidad de nuevas estrategias desarrolladas en los últimos años para incrementar la eficacia de la TFD, y los conceptos acerca de los mecanismos de muerte celular inducidos por diversos tratamientos fotodinámicos, nos planteamos el diseño del trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral a través de la siguiente **Hipótesis** de partida:

Las numerosas deficiencias que presentan las terapias aprobadas para el tratamiento del cáncer, incluida la TFD, han conducido al desarrollo de nuevas estrategias más específicas y eficaces. Centrándonos en la TFD, existen múltiples abordajes para intentar incrementar su eficacia, incluyendo: i) buscar fotosensibilizadores óptimos, ii) incrementar su especificidad de acumulación en las áreas tumorales, iii) combinar la TFD con otras modalidades terapéuticas y iv) administrar dos fotosensibilizadores, con distinta diana terapéutica y distinto mecanismo de acción, de forma similar a los protocolos clínicos utilizados en quimioterapia.

Partiendo de esta hipótesis, nos planteamos un **objetivo general**: investigar distintas estrategias que pudieran incrementar la eficacia de la Terapia Fotodinámica, como terapia antitumoral. Para alcanzar el objetivo general, nos propusimos cuatro **objetivos específicos**:

1. Caracterizar las propiedades fotobiológicas del porfíriceno catiónico de nueva síntesis (Py₃MeO-TBPO), como un nuevo FS para TFD.
2. Analizar la eficacia de las nanopartículas mesoporosas de sílice para vehiculizar fotosensibilizadores, concretamente la porfirina catiónica TMPyP.
3. Evaluar en profundidad la eficacia de los tratamientos fotodinámicos cuando se administran de forma simultánea dos fotosensibilizadores, en nuestro caso, ZnPc y TMPyP, tanto en cultivos (2D y 3D), como en ratones portadores de tumores trasplantados.
4. Determinar el papel de los cultivos 3D en los ensayos de Terapia Fotodinámica.

➤ **HYPOTHESIS**

Clinically approved oncologic therapeutic modalities, including PDT, have several disadvantages. This fact has led to the development of more specific and effective strategies. Focusing on PDT, there are multiple approaches in order to increase its efficacy, including: i) a search for ideal photosensitizers, ii) to enhance accumulation preferentially within tumor area, iii) a combination of PDT with conventional anticancer therapies and iv) simultaneous administration of two photosensitizers with different therapeutic target and diverse mechanism of action, in a similar way to clinical chemotherapy protocols.

➤ **MAIN OBJECTIVES**

1. To establish the photobiological properties of a newly synthesized cationic porphycene (Py₃MeO-TBPO) as a new PS for PDT.
2. To analyze the efficacy of mesoporous silica nanoparticles as delivery systems for photosensitizers, in particular the cationic porphyrin TMPyP.
3. To evaluate in depth the efficacy of PDT-treatments when two photosensitizers, in our case ZnPc and TMPyP, are simultaneously administered (in 2D and 3D cell cultures and in tumor-bearing mice).
4. To determine the importance of 3D models in Photodynamic Therapy assays.

MATERIALES Y MÉTODOS

“El trabajo sin prisa es el mayor descanso para el organismo”

Gregorio Marañón (1887-1960)



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cultivos celulares

○ En monocapa (2D)

El presente trabajo de investigación se ha llevado a cabo fundamentalmente utilizando la línea celular establecida **HeLa** (adenocarcinoma de cérvix humano). Sin embargo, algunas investigaciones se han llevado a cabo en otras líneas celulares establecidas (humanas y murinas):

- **MCF-7** (adenocarcinoma de mama humano).
- **HaCaT** (queratinocitos humanos transformados).
- **B78H1** (clon amelanótico murino obtenido del melanoma amelanótico B16).

Las células crecieron en el medio de cultivo DMEM (del inglés, *Dulbecco's modified Eagle's medium*) (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) o RPMI (del inglés, *Roswell Park Memorial Institute medium*) (Corning, NY, USA), suplementado con 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina y un 10% de suero fetal bovino (SFB) (Invitrogen, Paisley, UK), que fueron esterilizados mediante filtración (tamaño de poro 0.22 µm, Millipore Corp., Billerica, USA). Los cultivos celulares fueron mantenidos en un incubador a 37 °C (SteriCult 200; Huco-Erloss, España), en una atmósfera con un 5% de CO₂ y una humedad del 95%. Dependiendo del experimento las células fueron sembradas principalmente en: frascos de 25 cm² (F25) con ~9×10⁴ células, en placas de 24 pocillos con o sin cubreobjetos de vidrio de 10 mm de lado (~3.5×10³ células por pocillo), o en placas Petri de 35 mm de diámetro con cubreobjetos de 22 mm de lado (~2×10⁴ células). Todos los materiales eran de plástico desechable estéril de la marca Corning, y se trabajó en una cabina estéril de flujo laminar vertical. La densidad celular se controló mediante el uso de un microscopio invertido (Olympus CKX31, Tokio, Japón) en contraste de fase. Los experimentos se llevaron a cabo cuando las células se encontraban en fase exponencial y con una confluencia del 60-70% aproximadamente.

○ Tridimensionales (3D)

Los experimentos realizados en cultivos 3D se llevaron a cabo en células HeLa y en las siguientes líneas celulares humanas:

- **OVCAR-5** (adenocarcinoma de ovario humano).
- **MIA PaCa-2** (adenocarcinoma humano de páncreas).
- **hNDF** (fibroblastos humanos neonatales de la dermis).
- **Cocultivos de células HeLa + hNDF**

Se utilizaron diferentes cultivos basados en andamios proteicos naturales (extraídos de animales) y sintéticos. Dentro del grupo de los andamios naturales se emplearon matrices de **Matrigel™** de factor

de crecimiento reducido (GFR-Matrigel) y de **colágeno I** de alta concentración (HC). Ambos productos eran de la casa comercial BD Biosciences (NJ, USA).

El **Matrigel™** es una matriz formada por componentes de la membrana basal solubilizada (laminina, colágeno IV, entactina, heparan sulfato y factores de crecimiento), extraída de células de sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm de ratón. Brevemente, se pipetearon 250 µL de GFR-Matrigel en el centro de cada uno de los pocillos de placas de plástico de 24 pocillos no tratadas, transparentes o negras (si eran para experimentos que implicaban el uso de fluorescencia), previamente enfriadas (Corning). Posteriormente, las placas se pusieron en el incubador durante 30 min y se les añadió una suspensión de células OVCAR-5 o MIA PaCa-2 (500 µL de 7.5×10^4 células/ml), a cada pocillo. A continuación, se añadió medio de cultivo a una concentración final de 2% GFR-Matrigel, y se cambió cada 2-3 días. Finalmente, las células se dejaron proliferar hasta alcanzar una población de nódulos de más de 200 µm de diámetro (aproximadamente a los 10 días).

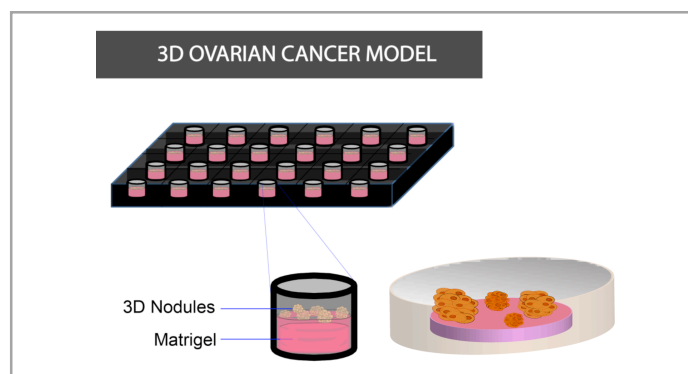


Figura 1. Representación esquemática de un cultivo 3D de células OVCAR-5 sobre Matrigel™.

Por otra parte, el **colágeno** es una de las principales proteínas de la MEC. La matriz de colágeno I representa una buena alternativa a los cultivos basados en andamios proteicos sintéticos como RAD16-I, ya que proporciona el espectro de las señales químicas y físicas de un tumor. Brevemente, para la preparación de las matrices, se mezcló el volumen necesario de colágeno I con medio de cultivo. Se ajustó el pH a 8-9 añadiendo NaOH (el color de la solución cambiaba de amarillo a rosa cuando estaba lista para usar, ya que se utilizó como indicador de pH el rojo fenol). A continuación, se mezcló la solución de colágeno I (0.14%) con el correspondiente volumen de suspensión celular (HeLa, hNDF o ambas líneas celulares), para obtener 2×10^6 células/ml. Se añadió el volumen correspondiente de la mezcla a cada pocillo, dejando gelificar en el incubador durante al menos 30 min a 37 °C y a continuación, añadimos 1 ml de DMEM a cada pocillo. Se cambió el medio cada día dejando 0.5 ml de DMEM en cada pocillo y añadiendo 0.5 ml de DMEM fresco.

Como matriz sintética se usó un modelo basado en el hidrogel del péptido autoensamblable **RAD16-I** (disponible comercialmente como BD™ PuraMatrix™), compuesto por una secuencia de 16 aminoácidos AcN-(RADA)₄-CONH₂ (R arginina, A alanina y D ácido aspártico). Este hidrogel forma una red de nanofibras interconectadas de 10-20 nm de diámetro y con un tamaño de poro de 50-200 nm, que rodea a las células. Las matrices de RAD16-I se prepararon desde el stock comercial de RAD16-I 1%, y se utilizó el péptido a una concentración de 0.5% (peso/volumen) en sacarosa. Explicado muy

brevemente, la solución peptídica se sonicó durante 5 min y las células HeLa o hNDF tripsinizadas, se resuspendieron en una solución de sacarosa al 10% para obtener una concentración final de 4×10^6 células/ml. Luego, se mezclaron los volúmenes correspondientes de la suspensión celular y de RAD16-I 1% para obtener una suspensión final de 2×10^6 células/ml en RAD 0.5%. A continuación, se añadieron 150 μ l de DMEM y 40 μ l de la mezcla (péptido + células) a cada pocillo de placas de 12 pocillos, lo que inducía la polimerización de la matriz, ya que RAD16-I es líquido a pH 3 y gelifica al entrar en contacto con el DMEM alcanzando un pH 7. Posteriormente, las muestras se situaron en el incubador, durante al menos 30 min a 37 °C, para favorecer la correcta gelificación y a continuación, se añadieron 850 μ l de DMEM a cada pocillo. Se cambió el medio cada día, dejando 0.5 ml de DMEM en cada pocillo y añadiendo 0.5 ml de DMEM fresco.

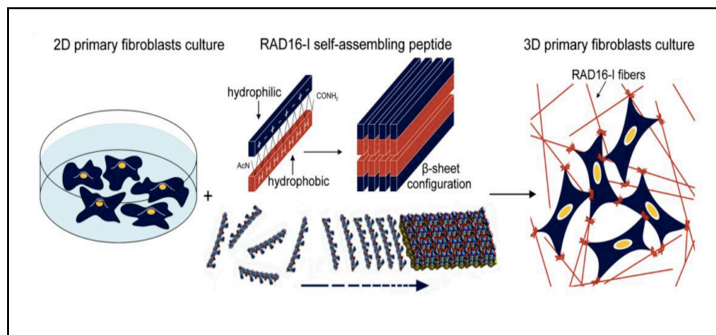


Figura 2. Representación esquemática de un cultivo 3D de células hNDF sobre PuraMatrix™.

2. Fotosensibilizadores (FSs)

El porfírceno tricatiónico 2,7,12-tris(α -piridinio-*p*-tolil)-17-(*p*-(metoximetil)fenil) (**Py₃MeO-TBPO**), fue sintetizado por el grupo de Ingeniería Molecular del Dr. Nonell (Institut Químic de Sarrià, Universitat Ramon Llull, Barcelona), como había sido descrito previamente.²⁰⁰ El espectro de fluorescencia de excitación y de emisión se analizó en un espectrofluorímetro Spex Fluoromax-4 (Horiba Jobin-Yvon, NJ, USA). Para los ensayos, se preparó una solución stock 0.1 mM en PBS (del inglés, *Phosphate Buffered Saline*) (Gibco, Paisley, UK) (1.2 mg en 10 ml de agua destilada) y las soluciones de trabajo se ajustaron a las concentraciones deseadas, utilizando DMEM filtrado con SFB al 1% (ϵ_{644} del **Py₃MeO-TBPO** = $280000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Este porfírceno, presenta un pico máximo de absorción en la región roja del espectro (644 nm), y su pico máximo de emisión de fluorescencia está en 657 nm.

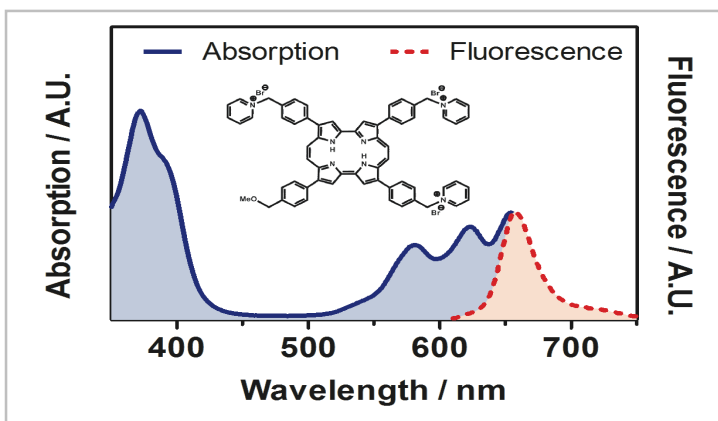


Figura 3. Espectro de absorción y de emisión del porfírceno **Py₃MeO-TBPO** tricatiónico. **Py₃MeO-TBPO**.

El derivado metálico de zinc(II) de la ftalocianina, **ZnPc** utilizada para los ensayos *in vitro* (2D) fue adquirida en Sigma-Aldrich. Antes de la realización de cada experimento, se preparó una solución madre 0.5 mg/ml en piridina (Panreac Química, Montcada i Reixac, España), y se almacenó a 4 °C hasta su uso. La **ZnPc** fue incorporada en liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (Sigma-Aldrich),

según el protocolo de inyección de Ginevra *et al.*,¹⁷¹ a una concentración final de 5×10^{-8} M. La solución de liposomas se esterilizó por filtración con un filtro de tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore Corp.), y se utilizó durante dos semanas para asegurar la estabilidad de los liposomas.

Para los ensayos con cultivos 3D e *in vivo*, se utilizó un stock de la ZnPc (CGP55847) formulada en liposomas de 2-oleoil-sn-glycero-3-fosfolina (POPC) y 1,2-dioleoil-sn-glycero-3-k-serina (OOPS), en una proporción de ZnPc: POPC: OOPS de 1:90:10 (en peso) y liofilizada. Esta formulación fue desarrollada por la empresa QLT Phototherapeutics (Vancouver, Canadá), está patrocinada por la empresa Ciba Geigy (Novartis, Basilea, Suiza) y fue amablemente cedida por el Profesor Giulio Jori (Universidad de Padua, Italia). El stock en agua desionizada o suero fisiológico, se diluyó a una concentración de uso de 0.5 mg/kg (0.9 $\mu\text{M/kg}$). La concentración de la solución stock de ZnPc-DPPC o ZnPC-POPC-OPPS, se midió utilizando un espectrofotómetro UV- 1601 de Shimadzu (Kyoto, Japón) y aplicando la ley de Lambert-Beer: $\text{Abs} = \epsilon cL$ (siendo Abs la absorción del compuesto, ϵ el coeficiente de extinción molar, ϵ_{671} de la ZnPc= $240000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; y L la distancia que atraviesa la luz a través de la muestra= 1 cm).

La porfirina catiónica *meso*-tetra(4-N-metilpiridil)porfina (TMPyP), procedía de Sigma-Aldrich. Un stock preparado en PBS a una concentración de 10^{-5} M, se diluyó directamente en PBS a una concentración final de 10^{-6} M para los ensayos *in vitro* de TFD ó a 4.1 mg/kg (3.6 $\mu\text{M/kg}$) para los ensayos con cultivos 3D o *in vivo*, la cual fue medida espectrofotométricamente aplicando la ley de Lambert-Beer, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar, ϵ_{424} del TMPyP= $194000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En los estudios de MSNPs las células HeLa se incubaran con TMPyP, se realizaron preparaciones de TMPyP a distintas concentraciones (0.075-1 μM) en DMEM (sin rojo fenol) (Gibco) suplementado con L-Glutamina al 1% y SFB al 10%.

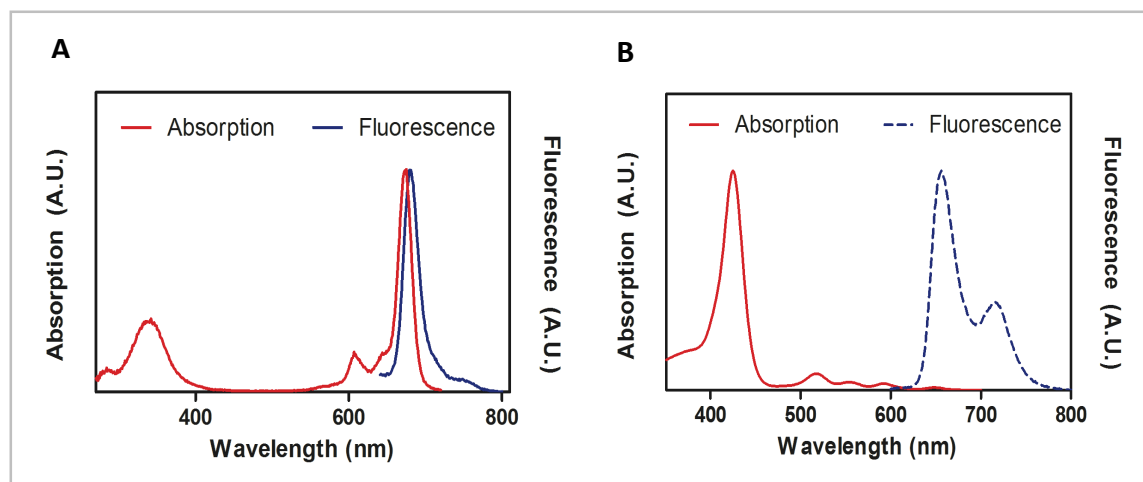


Figura 4. Espectros de absorción y de emisión de la ftalocianina de zinc(II) (A) y del TMPyP (B).

Para los ensayos realizados en cultivos 3D en MatrigelTM, se utilizó como FS la Verteporfin o BPD-MA (del inglés, *benzoporphyrin derivative monoacid ring A*) (QLT, Inc., Vancouver, Canadá). Para ello, se preparó un solución stock en DMSO, que se diluyó en DMEM a una concentración de 250 nM, la cual

fue medida espectrofotométricamente aplicando la ley de Lambert-Beer, teniendo en cuenta su coeficiente de extinción molar ($\epsilon_{435} = 80500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

3. Nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNPs)

Las nanopartículas mesoporosas de sílice (**MSNPs**) fueron sintetizadas y caracterizadas fisicoquímicamente por el grupo del Dr. Nonell. La superficie de las MSNPs tiene un potencial z negativo en medio acuoso ($-22 \pm 4 \text{ mV}$). Estas MSNPs poseen un diámetro de $245 \pm 45 \text{ nm}$, en medio acuoso y el tamaño del diámetro de poro es de $77 \pm 1 \text{ \AA}$. Los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia (excitando a 520 nm) de las MSNPs-TMPyP (en etanol y en PBS), se registraron con un espectrofluorímetro Spex Fluoromax-4 (Horiba Jobin-Yvon), y se compararon con los del TMPyP en etanol. En las medidas de generación de $^1\text{O}_2$ en muestras de MSNPs-TMPyP (en etanol y en agua), los transitorios se obtuvieron excitando las muestras a 532 nm y observando la fosforescencia del $^1\text{O}_2$ a 1275 nm . El estudio de la liberación de TMPyP que había sido encapsulado en las MSNPs a lo largo del tiempo (en etanol y en agua), se cuantificó centrifugando las MSNPs cargadas con el FS, durante 20 min a 7800 rpm y analizando la absorbancia del sobrenadante obtenido por espectrofotometría a los 15 , 30 y 45 días, aplicando la ley de Lambert-Beer.

Dicho laboratorio suministró un stock de MSNPs (sin TMPyP) a una concentración $27.4 \mu\text{M}$ en H_2O destilada y otro de MSNPs-TMPyP de concentración $13.7 \mu\text{M}$, también en H_2O destilada.

Para la incubación de las células con MSNPs sin TMPyP, un volumen del stock de MSNPs fue centrifugado con una centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415D, Alemania) 10 min a 13.000 rpm ($\times 2$). Se retiró el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en el mismo volumen de H_2O destilada, se pasó por un vórtex (Heidolph REAX 2000, Alemania) y se disgregó en un sonicador (Elma S30 H Elmasonic, Alemania) a intervalos de 5 min hasta su total resuspensión. Finalmente, se prepararon las disoluciones deseadas en DMEM y se esterilizaron mediante filtrado (tamaño de poro $0.45 \mu\text{m}$, Millipore Corp.). Las concentraciones utilizadas fueron las mismas que las de TMPyP (0.075 - $1 \mu\text{M}$).

Las nanopartículas con el FS incorporado (**MSNPs-TMPyP**) se prepararon siguiendo el mismo procedimiento que las nanopartículas de sílice sin TMPyP. Las preparaciones también fueron esterilizadas mediante filtrado (tamaño de poro $0.45 \mu\text{m}$, Millipore Corp.) y se analizaron sus concentraciones por espectrofotometría.

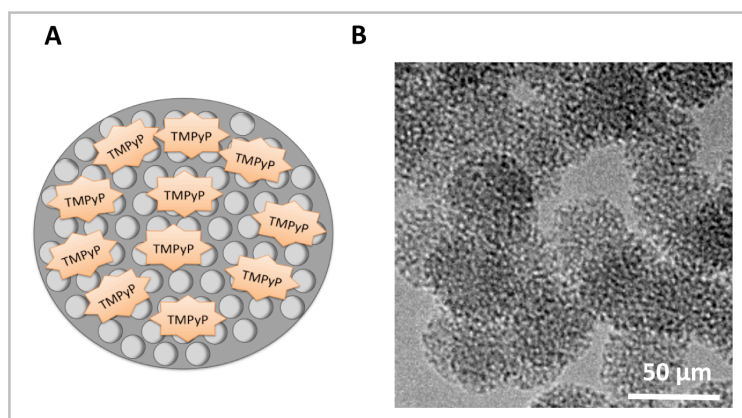


Figura 5. A: Dibujo esquemático de la adsorción del TMPyP en las MSNPs. B: Imágenes de TEM de MSNPs.

4. Tratamientos fotodinámicos

Para los tratamientos fotodinámicos con **Py₃MeO-TBPO**, las células HeLa incubadas durante 18 h con diferentes concentraciones (0.1-1 μ M) de Py₃MeO-TBPO en DMEM (con SFB al 1%), se lavaron tres veces con PBS (5 min) y antes de la exposición a la luz, se añadió DMEM (con SFB al 10%). Las irradiaciones se llevaron a cabo utilizando un dispositivo LED (Diodo Emisor de Luz) de luz roja ($\lambda=640 \pm 20$ nm) con una intensidad de 4 mW/cm² durante distintos tiempos (dosis totales de luz: 1.2, 2.4 o 3.6 J/cm²). El dispositivo de irradiación estaba compuesto por 384 LEDs y poseía un área de irradiación de 11 cm x 15 cm.

Los diferentes procesamiento s metodológicos, se llevaron a cabo, tanto inmediatamente después de la irradiación, como a diferentes intervalos de tiempo después de la misma. También se realizaron ensayos donde se incubaron las células durante 18 h con diferentes concentraciones de Py₃MeO-TBPO pero sin posterior irradiación, así como muestras irradiadas, que no habían sido preincubadas con el FS.

En el caso de los tratamientos fotodinámicos utilizando **ZnPc** y **TMPyP**, se sembraron células de distintas líneas celulares establecidas, en diferente material de plástico específico para el cultivo celular, dependiendo del procesamiento posterior. Se realizaron tanto tratamientos fotodinámicos tanto con un único FS, como con ambos. Para los tratamientos en **cultivos celulares 2D** o en el caso de muestras de **cultivos 3D** de **colágeno** o de **RAD16-I** bajo las condiciones denominadas *in vitro*, las células fueron incubadas durante 1 h con: ZnPc (5×10^{-8} M), TMPyP (10^{-6} M) y ZnPc + TMPyP (5×10^{-8} M y 10^{-6} M respectivamente). A continuación, todas las muestras fueron lavadas con PBS (5 min, 3 veces) y se dejaron en medio de cultivo DMEM (SFB al 10%). Posteriormente, se irradiaron durante 10 o 15 min con el dispositivo LED de luz roja descrito para los ensayos con Py₃MeO-TBPO (dosis total de luz: 2.4 o 3.6 J/cm², respectivamente) en el caso de los cultivos 2D, o con un dispositivo LED de luz roja ($\lambda=620-645$ nm) (Sorisa, Photocare LED) con una intensidad de 29 mW/cm² (dosis total de luz: 3.6 J/cm²), en el caso de los cultivos 3D. Una vez finalizado el tratamiento, las células se mantuvieron en el incubador hasta que transcurría el intervalo de tiempo seleccionado para su procesamiento (30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 18, 24 ó 48 h). Previamente, se llevaron a cabo experimentos de incubación con los correspondientes FSs pero sin posterior irradiación, para analizar el posible efecto citotóxico que ejercían por sí mismos, tanto los FSs de forma individual como combinados, lo que se conoce en TFD como: toxicidad en la oscuridad. Como en todos los protocolos experimentales llevados a cabo, también se analizó la posible citotoxicidad inducida por la irradiación con luz roja en las distintas líneas celulares empleadas. Es importante señalar que las condiciones anteriormente descritas se escogieron tras haber realizado diversos estudios previos, tanto con distintas concentraciones de los FSs como con diferentes tiempos de irradiación.

Para los ensayos con **ZnPc** y **TMPyP** realizados *in vivo* con ratones C57BL/6 o en cultivos 3D bajo las condiciones denominadas *in vivo*, se realizaron tanto tratamientos fotodinámicos con un único FS, como con ambos.

En el caso de los ensayos *in vivo*, se utilizaron como modelos experimentales hembras de ratones C57BL/6 (18-20 g de peso corporal) obtenidas de Charles River (Como, Italia). Se trasplantaron células B78H1 en la zona pectoral derecha de los ratones, mediante una inyección subcutánea de 20 μ l (10^6 células) de una suspensión celular estéril en PBS. A los 10-15 días después de la inyección subcutánea de las células B78H1,

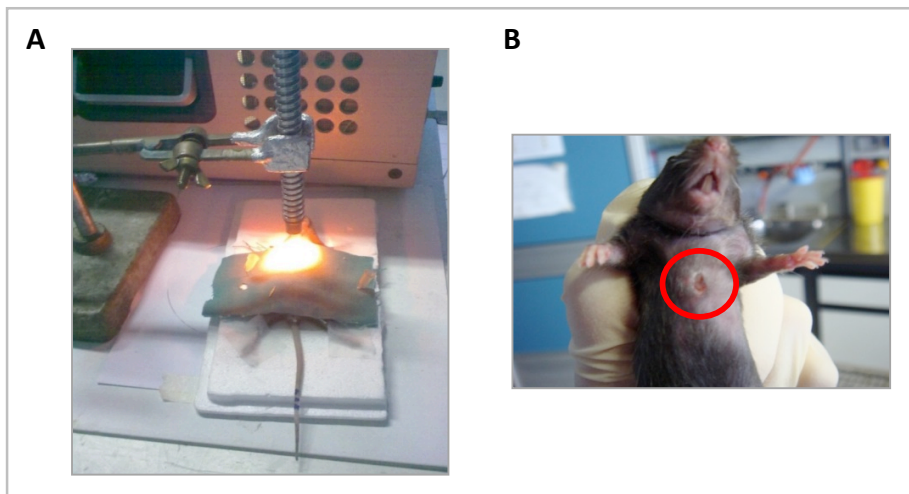


Figura 6. A: Ratón C57BL/6 durante un tratamiento de TFD. B: Ratón tratado con el protocolo de TFD combinado (inyección ZnPc + TMPyP e irradiación de 300 J/cm² a las 24 h) a los 12 días después de finalizar el tratamiento.

cuando el diámetro externo del tumor estuvo en el rango de 0.4-0.6 cm, se inyectaron por vía intravenosa (i.v.), en la vena caudal de la cola de los ratones, ambos FSs (de manera individual o combinada). La ZnPc a una concentración de 0.5 mg/kg y/o el TMPyP a una concentración de 4.1 mg/kg, de masa corporal. Se utilizaron al menos 6 ratones por grupo de tratamiento. Transcurridas 3 ó 24 h después de la inyección de los FSs, cuando una cantidad significativa de FS estaba aún presente en el suero sanguíneo ó para permitir la acumulación de los FSs en la lesión neoplásica, se procedió a anestesiarse a los animales con Zoletil® + Xilor® antes de someterlos a la irradiación de la zona tumoral. La irradiación se realizó usando luz de una longitud de onda de 600-700 nm, procedente de una lámpara de cuarzo-halógeno (Teclas, Lugano, Suiza). La fuente de luz se empleó a una tasa de fluencia de 175 mW/cm², y la dosis total de luz suministrada fue de 300 J/cm².

En el caso de los **cultivos 3D de colágeno o RAD16-I** bajo las condiciones denominadas *in vivo*, se realizaron diferentes tratamientos fotodinámicos para comparar la eficacia de inactivación celular del tratamiento combinado (ZnPc + TMPyP) *in vivo*, respecto a los cultivos 3D. Para ello, basándonos en las condiciones de TFD utilizadas descritas anteriormente, se seleccionaron los siguientes tratamientos:

- Incubación de 3 h con 0.5 mg/kg ZnPc + 50 ó 70 J/cm²
- Incubación de 3 h con 4.1 mg/kg TMPyP + 70 J/cm²
- Incubación de 3 h con ambos FSs + 50 ó 70 J/cm²
- Irradiación 70 J/cm² sin preincubación con FS
- Incubación de 3 h con ambos FSs sin irradiación

Condiciones más
~ a *in vivo*

Las células fueron incubadas durante 3 h con: ZnPc (0.5 mg/kg), TMPyP (4.1 mg/kg) o con ambos FSs. A continuación, se lavaron con PBS (5 min, 3 veces) y se dejaron en medio de cultivo DMEM con SFB al 10%. Posteriormente, se irradiaron con un dispositivo LED de luz roja (λ =620-645 nm) (Sorisa,

Photocare LED) con una intensidad de 29 mW/cm^2 (dosis total de luz: 50 o 70 J/cm^2). Una vez finalizado el tratamiento, las células se mantuvieron 24 h en el incubador para después ser procesadas para los distintos ensayos realizados. Previamente, se llevaron a cabo experimentos de incubación con los correspondientes FSs pero sin posterior irradiación, para analizar el posible efecto citotóxico que ejercían por sí mismos, tanto los FSs de forma individual como combinados. También se analizó la posible citotoxicidad inducida por la simple irradiación con luz roja (70 J/cm^2) en las distintas líneas celulares empleadas. Para los ensayos realizados *in vivo* con ratones C57BL/6, se utilizó una dosis de luz superior (300 J/cm^2), pero debido a que la fuente de irradiación era distinta a la utilizada en Padova y poseía menor tasa de fluencia (175 vs 29 mW/cm^2), para los ensayos 3D se decidió utilizar 70 J/cm^2 (y además 50 J/cm^2 en el caso de los cultivos 3D de colágeno), para poder comparar los resultados obtenidos. Además, había que tener en cuenta la limitación de que los cultivos 3D deberían estar fuera del incubador durante la irradiación y ya que 300 J/cm^2 equivalía aproximadamente a 3 h de irradiación, no quisimos que este factor pudiera afectar a la viabilidad celular.

Para los ensayos con cultivos 3D en **Matrigel**TM, las células OVCAR-5 se incubaron durante 90 min con $0.25 \text{ } \mu\text{M}$ BPD-MA en DMEM. Inmediatamente antes de la irradiación, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS y se añadió DMEM al 2% GFR- MatrigelTM. Cada placa se irradió con un láser de diodo con fibra acoplada de 690 nm (High Power Devices, Inc., NJ, USA) con una tasa de fluencia de 150 mW/cm^2 y una dosis total de luz de 5 J/cm^2 . Una vez finalizado el tratamiento, las células se mantuvieron en el incubador hasta que transcurría el intervalo de tiempo seleccionado para su procesamiento.

En relación con los protocolos realizados utilizando **MSNPs**, primero se llevaron a cabo experimentos de incubación con TMPyP en su forma libre, MSNPs sin TMPyP y MSNPs-TMPyP sin irradiación posterior; para analizar el posible efecto citotóxico del FS y de las MSNPs en oscuridad. Para los tratamientos fotodinámicos se sembraron células HeLa tanto en placas de 12 y 24 pocillos con cubreobjetos de vidrio, como en placas Petri de 35 mm con cubreobjetos. Las células fueron incubadas durante 18 h con TMPyP, MSNPs sin TMPyP incorporado y MSNPs-TMPyP en DMEM con SFB al 10% (a las concentraciones deseadas en los correspondientes experimentos; de 0.075 - $1 \text{ } \mu\text{M}$). A continuación, se lavaron las muestras con PBS (3 veces), se añadió DMEM y se irradiaron inmediatamente después de los tratamientos. La irradiación se realizó usando un proyector de diapositivas Reflecta equipado con una lámpara de 150 W . La luz se filtró a través de una capa de 3 cm de agua para absorber el calor generado y un filtro azul-violeta ($380 < \lambda < 440 \text{ nm}$). La intensidad de la luz en el lugar de la irradiación fue de 8 mW/cm^2 . Las mediciones de la intensidad de la luz se realizaron con un medidor de energía M8 Spectrum Power. Las células HeLa se irradiaron durante 10 o 15 min correspondientes a una dosis total de luz de 4.8 o 7.2 J/cm^2 , respectivamente. Una vez finalizado el tratamiento, las células se mantuvieron en el incubador hasta que transcurría el intervalo de tiempo seleccionado para su procesamiento. Las condiciones anteriormente descritas, se escogieron tras haber realizado diversos estudios previos, tanto con distintas concentraciones de TMPyP, MSNPs y MSNPs-TMPyP, como con diferentes tiempos de irradiación.

Todos los tratamientos fotodinámicos descritos en este apartado se repitieron al menos tres veces. Para facilitar el seguimiento de los distintos ensayos realizados, a continuación se muestra la tabla resumen de los tratamientos de TFD más significativos.

Tabla 1. Resumen de los tratamientos de TFD utilizados.

PDT Treatments					
Model	FS	[FS]	Incubation Time	Light Dose (J/cm ²)	λ irradiation (nm)
2D Cultures	Py3MeO-TBPO	0.1 - 1 μ M	18 h	1.2, 2.4 and 3.6	620 - 660
	ZnPc	0.05 μ M	1 h	2.4 and 3.6	620 - 660
	TMPvP	1 μ M	1 h	2.4 and 3.6	620 - 660
	MSNPs-TMPvP	0.075 - 1 μ M	18 h	4.8 and 7.2	380 - 440
In vivo	ZnPc	0.9 μ M/kg	3 or 24 h	300	600 - 700
	TMPvP	3.6 μ M/kg	3 or 24 h	300	600 - 700
3D Cultures	ZnPc	0.05 μ M / 0.9 μ M/kg	1 or 3 h	3.6, 50 and 70	620 - 645
	TMPvP	1 μ M / 3.6 μ M/kg	1 or 3 h	3.6 and 70	620 - 645
	BPD-MA	0.25 μ M	1h 30 min	5	690

5. Ensayos de viabilidad

○ MTT

La citotoxicidad inducida por los distintos tratamientos fotodinámicos detallados en el apartado anterior, se evaluó mediante el ensayo colorimétrico del MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) de Sigma-Aldrich. Este ensayo está basado en la capacidad del enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, de reducir el MTT a formazán, un compuesto de color violeta insoluble en medios acuosos. Permite evaluar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas, que es proporcional al número de células vivas. El MTT es uno de los métodos más utilizados para medir la supervivencia y proliferación celular. Además, en cada experimento se realizó un blanco (pocillos sin células), para restar la interferencia que el DMSO y el plástico de la placa de cultivo tienen sobre los valores obtenidos en la absorbancia del formazán.

Para ello, en el caso de los cultivos 2D las células fueron sembradas en placas de 24 pocillos sin cubreobjetos, y para los cultivos 3D se utilizaron matrices sintetizadas (como se ha explicado en el apartado 1). Después de los correspondientes protocolos experimentales, se realizó el MTT 24 y 48 h después de finalizar los tratamientos. El **método del MTT**²⁰¹ se llevó a cabo a partir de una solución madre de MTT (1 mg/ml) en PBS. El stock se diluyó en DMEM hasta una concentración final de 50 μ g/ml (2D) y de 0.5 mg/ml (3D), y se añadieron 500 μ l de la mezcla a cada pocillo. Las células se mantuvieron en el incubador durante 3 h y posteriormente, se retiró el medio. Los cristales de formazán se disolvieron añadiendo 0.5 ml de DMSO (dimetilsulfóxido, Panreac Química) y la absorbancia fue medida a 570 nm en un lector de placas Fluor Spectra (Tecan, Männedorf, Suiza). De forma similar, se realizaron experimentos para analizar la posible toxicidad de los FSs -tanto de forma individual como combinada- en oscuridad (sin posterior irradiación) o de muestras sólo irradiadas sin una previa incubación con FS. El porcentaje de viabilidad celular, se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Viabilidad celular} = (\text{D.O. células tratadas} / \text{D.O. células control}) \times 100$$

Siendo D.O. la densidad óptica de las muestras a 570 nm. Los datos presentados corresponden a los valores medios y las desviaciones estándar (DE) de al menos 5 experimentos diferentes.

○ Azul tripán *in situ*

El azul tripán (en inglés, trypan blue) es un colorante vital que es excluido de las células viables. El colorante se acumula en las células no viables (tiñéndolas de azul) cuando han perdido la integridad de la membrana plasmática. La prueba se realizó directamente en los pocillos de las placas de 12 o 24 pocillos (sin tripsinización) para evaluar la eficacia de fotosensibilización celular.

Para este ensayo las células HeLa se incubaron 18 h con TMPyP, MSNPs sin TMPyP y MSNPs-TMPyP 0.075, 0.1 y 1 μM en medio de cultivo. Se analizaron preparaciones sin irradiar y preparaciones irradiadas con luz azul (4.8 y 7.2 J/cm^2) a las 24 h. Para los tratamientos con el $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$, se realizó este ensayo a las 3 y 24 h después de una incubación 18 h con 0.5 y 0.75 μM + 3.6 J/cm^2 de irradiación roja. Para analizar las muestras se retiró el medio de cultivo y se tiñeron durante 5 min con azul tripán (Sigma-Aldrich) al 0.4% (p/v) en PBS. A continuación, se hicieron tres lavados con PBS y las preparaciones se observaron y fotografiaron usando un microscopio invertido (Leica DMIL LED, Wetzlar, Alemania).

Además, se realizó un recuento de la viabilidad celular (mediante el uso de un hemocitómetro), expresada como porcentaje de células viables respecto al total de células. El total de células analizadas en cada muestra fue de aproximadamente 1000 células.

$$\% \text{ Viabilidad celular} = \text{células viables} / \text{células totales (viables + muertas)} \times 100$$

○ LIVE/DEAD®

El ensayo se llevó a cabo 24 h después de los diferentes tratamientos con BPD-MA realizados en cultivos 3D de células OVCAR-5 crecidas en **Matrigel™**. Los cultivos se incubaron con los reactivos del kit LIVE/DEAD™ (Invitrogen): Calceína AM (calceína acetoximetil éster) (marca las células viables), y bromuro de etidio (se intercala en el ADN de las células no viables). Este marcaje bicolor se basa en la actividad esterasa intracelular que se mantiene en las células viables y a su vez, en el mantenimiento de la integridad de la membrana plasmática. De esta manera, el bromuro de etidio sólo es permeable en las células muertas, que han perdido la integridad de su membrana, y la calceína emite fluorescencia sólo en las células viables. La calceína AM es un compuesto hidrofóbico que atraviesa la membrana plasmática de las células de forma pasiva. Una vez en el citoplasma, las esterases intracelulares hidrolizan la calceína AM, dando lugar a un derivado fluorescente (la calceína libre). Al ser hidrofílico, el derivado no puede atravesar libremente la membrana plasmática y queda atrapado en el interior de las células viables.

Se añadió a cada pocillo la mezcla: calceína + bromuro de etidio + PBS (en relación 0.5 μl calceína + 2 μl bromuro de etidio + 1 ml PBS). Se incubaron 30 min en la oscuridad a 37 °C. A continuación, se lavaron las muestras 3 veces con PBS y se visualizaron en un microscopio confocal Olympus FV-1000 usando el objetivo X4 (excitación 488 nm, con filtro de emisión de FITC y excitación 559 nm, con filtro

de emisión TRITC, para calceína y bromuro de etidio, respectivamente). Las imágenes tomadas de los diferentes pocillos se procesaron y cuantificaron con el programa MATLAB (Mathworks, MA, USA). La viabilidad celular se cuantificó por la relación entre la emisión de fluorescencia de la calceína y la intensidad total de fluorescencia (calceína más bromuro de etidio). Cabe destacar que además de un grupo de muestras control (no tratadas), se utilizó un grupo control de muerte (células fijadas en 2% formalina durante 2 min y permeabilizadas posteriormente con 0.05% Tritón X-100 en PBS 5 min).

○ **Sytox® Blue**

Este ensayo se utilizó en cultivos 3D. A las 24 h de la finalización de los tratamientos combinados de TFD con ZnPc y TMPyP utilizando diferentes concentraciones de FSs, tiempos de incubación y dosis de luz, como se ha comentado en el apartado 4, se evaluó la viabilidad celular de diferentes cultivos 3D de colágeno I y RAD16-I, mediante citometría de flujo utilizando el colorante Sytox® Blue (Molecular Probes, OR, USA). Esta sonda se une con una alta afinidad al ADN de las células muertas que han perdido la integridad de su membrana plasmática, pero no penetra en las células con membrana intacta (células viables). Así, a las 24 h de los correspondientes tratamientos fotodinámicos, las muestras de RAD16-I se incubaron 15 min con 0.05% tripsina-EDTA (1X) con rojo fenol (Gibco), y las de colágeno durante 15 min con collagenasa (1mg/ml; Sigma-Aldrich). A continuación se añadieron 200 µl de DMEM, se pipetearon 5 min las muestras para romper las matrices, y se centrifugaron 5 min a 1500 rpm. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con DMEM sin rojo fenol para obtener 150 µl de suspensión celular con 1×10^6 células/ml. A continuación, las muestras se incubaron con 1 µM Sytox® Blue durante 5 min a temperatura ambiente (en oscuridad) y se analizaron inmediatamente -sin lavar- mediante citometría de flujo, ya que este colorante no es fluorescente en medio acuoso. Su longitud de onda de excitación es 405-440 nm, y la de emisión 470-480 nm.

Cabe destacar que para obtener el número de células necesario para realizar correctamente el experimento, se utilizaron 4 matrices por muestra de interés.

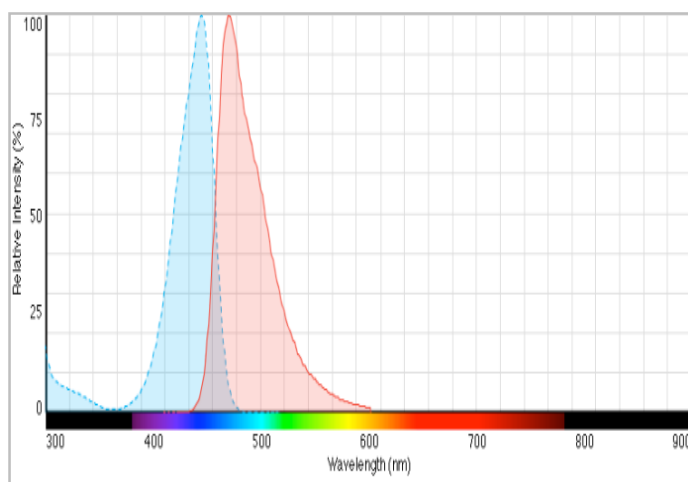


Figura 7. Espectros de absorción y de emisión del colorante Sytox®. Tomada de <http://www.lifetechnologies.com/content/dam/LifeTech/Documents/spectra/images/11348dna.jpg>

○ Análisis del efecto inducido por tratamientos combinados

El efecto del tratamiento combinado de TFD en cultivos celulares 2D con ZnPc (5×10^{-8}) M + TMPyP con (10^{-6} M) + 2.4 J/cm^2 de dosis de luz, fue valorado mediante el método de Valeriote y Lin,²⁰² 24 y 48 h después del tratamiento.

Teniendo en cuenta que: **[A]** representa la viabilidad celular para el tratamiento A (en nuestro caso ZnPc), **[B]** la viabilidad celular para el tratamiento B (en nuestro caso TMPyP), y **[A + B]** el porcentaje de viabilidad celular para el tratamiento combinado A + B (en nuestro caso ZnPc + TMPyP). Los efectos combinados se definen como:

- **sinérgico:** $[A + B] < [A] \times [B] / 100$
- **aditivo:** $[A + B] = [A] \times [B] / 100$
- **subaditivo:** $[A] \times [B] / 100 < [A + B] < [A]$, si $[A] < [B]$
- **interferencia:** $[A] < [A + B] < [B]$, si $[A] < [B]$
- **antagónico:** $[B] < [A + B]$, si $[A] < [B]$

6. Análisis de las alteraciones en la morfología celular

○ Tinción con Rojo Neutro (RN; neutral red)

Para el análisis de la morfología general de las células después de los distintos tratamientos fotodinámicos, se utilizó el colorante RN (Panreac Química), que se preparó al 0.5% en H₂O destilada. Tras el correspondiente intervalo de tiempo, después de los tratamientos fotodinámicos, las células sembradas y crecidas en placas de 24 pocillos con cubreobjetos, se fijaron 5 min en metanol frío y se dejaron secar. A continuación, se tiñeron durante 2 min con RN, se lavaron con H₂O destilada, se dejaron secar de nuevo, se pasaron por Xilol, y se montaron en DePex (Serva, Heidelberg, Alemania). También se tiñeron muestras de células de los correspondientes controles: células sin incubar ni irradiar, incubadas con FS pero no irradiadas y células control irradiadas. Las observaciones se realizaron al microscopio óptico de campo claro (ver apartado 19).

En algunos casos, las células se observaron en **contraste de fase** o en microscopía de **contraste de interferencia diferencial** (differential interference contrast, **DIC**), en un microscopio invertido, evitando de este modo posibles artefactos durante el procesamiento.

○ Tinción con Hoechst-33258 (H-33258)

La morfología nuclear de las células sometidas a los distintos tratamientos se valoró mediante tinciones con H-33258, un fluorocromo que se une específicamente al ADN. Se utilizó una solución de H-33258 (Sigma-Aldrich) 5 µg/ml en H₂O destilada, obtenida a partir de una solución madre 1 mg/ml. Una vez cumplido el intervalo de tiempo tras los correspondientes tratamientos fotodinámicos, las células se fijaron 5 min en metanol frío, se dejaron secar y se tiñeron 3 min con Ho. Posteriormente, se lavaron con H₂O destilada, se dejaron secar, se pasaron por Xilol, y se montaron en DePex. También se tiñeron

muestras de los controles comentadas en el apartado anterior. Las observaciones se realizaron al microscopio óptico de fluorescencia (ver apartado 19).

○ Microscopía electrónica de barrido

Las células control y las tratadas (2D y 3D), sembradas en cubreobjetos redondos de 10 mm de diámetro (2D) o como se explica en el apartado 1 en el caso de las muestras 3D, fueron fijadas durante 1 h a temperatura ambiente, en glutaraldehído (Laboratorios Taab, Berkshire, UK) al 3% en PBS estéril, para su observación en el microscopio electrónico de barrido (scanning electron microscopy, SEM). Posteriormente, se lavaron con PBS y se posfijaron en tetraóxido de osmio (OsO_4 , Laboratorios Taab) al 1% en PBS durante 1 h. A continuación, las muestras se lavaron con PBS y se deshidrataron 5 min en concentraciones crecientes de etanol en agua destilada (30, 50, 70, 90 y 100 %), se les realizó el punto de secado crítico, se recubrieron con oro al 10% usando los instrumentos Emitech K850 y SC502. Las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico de barrido Phillips XL30 perteneciente al servicio interdepartamental de investigación (SIdI) de la UAM, a una tensión de aceleración de 20 kV.

Para la obtención de las micrografías de muestras de MSNPs, se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-5310 (trabajando a 20 kV). Las muestras de NPs en EtOH absoluto se recubrieron previamente con una fina película de oro antes de la observación.

○ Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

A diferentes intervalos de tiempo después de los tratamientos de TFD, muestras de cultivos 2D o 3D, fueron fijadas en una mezcla de: glutaraldehído (2%) + ácido tánico (1%) en 0.4 M de tampón HEPES a pH 7.2 durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación, se postfijaron en una mezcla de: tetróxido de osmio (1%) + ferricianuro de potasio (0.8%) en PBS (Taab) durante 1 h; se deshidrataron y se embebieron en Epon. Secciones ultrafinas fueron doblemente teñidas con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras se observaron y fotografiaron en un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-1011 usando una cámara Gatan Erlangshen ES 1000 W.

En el caso de los ensayos realizados *in vivo*, a intervalos de tiempo predeterminados (6, 24 y 72 h) después de finalizar la TFD, se sacrificaron 3 ratones por grupo de tratamiento, y el tejido tumoral se fijó en una mezcla de: glutaraldehído al 1% + paraformaldehído al 4% , ambos en PBS, durante toda la noche a 4 °C. A partir de este punto, el protocolo seguido fue el mismo que el utilizado para las muestras de 2D y 3D.

○ Microscopía óptica de campo oscuro

La microscopía de campo oscuro se utilizó para analizar y comparar los patrones de proliferación celular de cultivos 3D control (MatrigelTM) de células OVCAR-5 y MIA PaCa-2. Concretamente se analizó el tamaño y el número de los nódulos formados en función del tiempo transcurrido, desde el 3^{er} día después de la siembra hasta el día 20. Se adquirieron imágenes de 5 campos (por muestra y por intervalo de tiempo), utilizando un microscopio invertido (Zeiss Axiovert 100 TV, Zeiss, Alemania) con una cámara CCD (Quantifire XI, Optronix, Israel), empleando el objetivo x5.

⊖ Tinciones histológicas con Hematoxilina-Eosina

Se realizaron estudios histológicos de los tumores de ratones C57BL/6 control no tratados, de ratones sometidos a irradiación sin previa inyección de FS y de ratones inyectados i.v. con: ZnPc (0.5 mg/kg), TMPyP (4.1 mg/kg) o ZnPc (0.5 mg/kg) + TMPyP (4.1 mg/kg) sometidos a un ciclo de TFD (300 J/cm²), a las 3 h y a las 24 h después de su inyección. Se recogieron muestras a las 6, 24 y 72 h después de cada tratamiento. Parte de las muestras fueron analizadas mediante una tinción con H-E. Con este fin, las muestras de tejido tumoral se lavaron con PBS para mantenerlas en condiciones isotónicas y en perfectas condiciones de hidratación. A continuación, fueron fijadas en paraformaldehído (3.7%) en H₂O destilada, durante 24 h a 4 °C. Posteriormente, se lavaron durante 60 min en H₂O destilada, se deshidrataron en series crecientes de alcoholes antes de su inclusión en parafina (60 min en etanol 30%, 60 min en etanol 50%, 60 min en etanol 70%, 60 min en etanol 96%, 30 min en etanol puro (x2)), y se dejaron en n-Heptano puro en una estufa a 56 °C durante 10 min. Posteriormente, se dejaron 24 h en parafina pura a 56 °C y por último se incluyeron en un bloque de parafina. Finalmente, el bloque de parafina se cortó con un micrótopo en secciones histológicas de 5 µm de espesor y se montaron sobre portaobjetos con poli L-lisina (Thermo Scientific).

Los estudios morfológicos se realizaron en las secciones desparafinadas (15 min en n-Heptano 100%, Panreac), hidratadas en series de alcohol decrecientes (15 min en etanol absoluto, 5 min en etanol 96% y 5 min en etanol 70%, Panreac) y lavadas con agua destilada durante al menos 10 min. En el caso de la tinción con H-E, las secciones se tiñeron con hematoxilina de Harris (Panreac) durante 5 min, se lavaron abundantemente con agua y se sumergieron en eosina (Panreac) durante 6 min. Finalmente, se lavaron con agua, se deshidrataron en series crecientes de alcohol (5 min en etanol 70%, 5 min en etanol 96% y 5 min en etanol absoluto), se pasaron por n-heptano y se montaron con DePex (Serva).

7. *Caracterización de los mecanismos de muerte celular inducidos*

○ Análisis por citometría de flujo (células HeLa)

La sonda fluorescente yoduro de 3,3'-dihexyloxacarbocianina (**DiOC₆(3)**) (Sigma-Aldrich) fue utilizada para determinar, mediante citometría de flujo, las variaciones en el **potencial de membrana mitocondrial** ($\Delta\Psi_m$) en ~ 10.000 células HeLa, 1 y 18 h después del tratamiento fotodinámico sinérgico [1 h de incubación con ZnPc (5 x 10⁻⁸ M) + TMPyP (10⁻⁶ M) + irradiación (2.4 J/cm²)]. Las células HeLa control y tratadas crecidas en frascos F25, fueron tripsinizadas, centrifugadas durante 5 min a 1500 rpm, e incubadas en la oscuridad con DiOC₆(3) a 40 nM en PBS durante 30 min a 37 °C. Las mediciones se realizaron utilizando un citómetro de flujo Coulter Epics XL-MCL (Beckman-Coulter Inc., CA, USA) con un laser de argón a 488 nm.

Además, se utilizó el Kit de detección de apoptosis ApoScreen™ Annexin-V (Southern Biotechnology Associates Inc., CA, USA) con el fin de detectar uno de los primeros eventos que suceden durante la inducción de este mecanismo de muerte, la **externalización ó traslocación de la fosfatidilserina** (phosphatidylserine, PS) en la membrana plasmática. La PS es un fosfolípido presente en la cara interna de la membrana plasmática, que pasa a localizarse en la monocapa externa de la bicapa lipídica, poco después de la inducción de la apoptosis, actuando como señal para atraer a los fagocitos,

que endocitan los cuerpos apoptóticos resultantes del proceso de muerte celular. Este ensayo emplea la molécula **anexina-V** (marcada con isotiocianato de fluoresceína, FITC), que posee una fuerte y específica afinidad por la PS, permitiendo monitorizar su traslocación durante la apoptosis sin necesidad de fijar las células. El uso de la anexina-V-FITC en combinación con el agente intercalante del ADN, **ioduro de propidio** (propidium iodide, PI), permite discriminar las células apoptóticas tempranas (anexina⁺, PI⁻), de las células apoptóticas tardías o necróticas (anexina⁺, PI⁺). Para este ensayo, se tripsinizaron células HeLa 30 min, 1, 2 y 3 h después del tratamiento sinérgico, se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm, se lavaron dos veces en PBS frío y se resuspendieron en tampón de unión frío 1X a una concentración de 1×10^6 células/ml. Posteriormente, se añadieron 10 µl de anexina-V-FITC a 100 µl de la suspensión celular. Cada tubo de citometría se agitó con el vórtex suavemente y se incubaron durante 15 min en hielo, protegidas de la luz. Sin lavar, se añadieron 380 µl de tampón de unión frío 1X + 10 µl de PI (50 µg/ml) a cada tubo y las muestras se analizaron inmediatamente, utilizando el citómetro descrito anteriormente con una línea de láser de argón a 488 nm.

Asimismo, analizamos la cinética de activación de la **caspasa-3 activa** (efectora), a distintos intervalos de tiempo (30 min, 1, 2, 3, 4 y 6 h) después de los tratamientos fotodinámicos con ZnPc y TMPyP, para la obtención de una cuantificación de la señal de emisión de fluorescencia. Se partió de células sembradas y tratadas en F25. Se retiró el medio de cultivo, se lavaron las muestras con PBS y se incubaron con tripsina 0.05% durante 5 min, bloqueando la reacción con DMEM sin rojo fenol. A continuación, se realizaron varias centrifugaciones durante 5 min a 1500 rpm y posteriormente, se fijaron las células en paraformaldehído al 2% durante 10 min a temperatura ambiente. Tras sucesivas centrifugaciones se resuspendieron en metanol al 90% y se almacenaron durante 24 h a -20 °C. Transcurrido ese tiempo, las células se centrifugaron y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% en PBS durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron una vez más, y se resuspendieron e incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario monoclonal de conejo anti-caspasa-3 activa (Sigma-Aldrich) a una concentración 1:50 en solución bloqueante [5% de albúmina de suero bovino (BSA), 5% de SFB, 0.02% de Tritón X-100 en PBS]. Posteriormente, las células se centrifugaron y se resuspendieron en Tritón X-100 al 0.1% en PBS durante 5 min a temperatura ambiente. Se volvieron a centrifugar y se incubaron durante 1 h a 37 °C con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo conjugado con FITC (Molecular Probes), a una concentración 1:200 en solución bloqueante. Finalmente, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS (3 veces) y se analizaron por citometría de flujo.

○ Ensayo TUNEL en cultivos en monocapa

La fragmentación internucleosomal del ADN asociada a procesos apoptóticos, se evaluó mediante el ensayo TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labelling), de la casa comercial Roche (Mannheim, Alemania). Esta prueba está basada en la capacidad del enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT), de catalizar la adición a los extremos 3'-OH libres del ADN, generados durante la apoptosis, de moléculas de dUTP marcadas con FITC, marcando de este modo los núcleos que han sufrido un mecanismo de muerte de tipo apoptótico.

El ensayo TUNEL se llevó a cabo en células control irradiadas, crecidas sobre cubreobjetos de 10 mm, así como con células incubadas con los distintos FSs y en las que se llevaron a cabo distintos protocolos de TFD explicados detalladamente en el apartado 4. El ensayo se realizó a diferentes

intervalos de tiempo después de los tratamientos fotodinámicos (3, 6 y 24 h). En todos los casos, las muestras se fijaron 20 min en formol-PBS (1:10). Posteriormente, se lavaron con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1 % en PBS durante 2 min. A continuación, se pusieron en una cámara húmeda y se incubaron durante 1 h a 37 °C con 25 µl de la mezcla TUNEL (22.5 µl de TUNEL marcador + 2.5 µl de TUNEL enzima, por muestra). Posteriormente, se lavaron con PBS y se montaron en ProLong Gold (Molecular Probes, Oregon, EE UU). Las observaciones se realizaron al microscopio de fluorescencia (ver apartado 19).

○ Ensayo TUNEL en tejidos (inmunohistofluorescencia e inmunohistoquímica)

Como se ha descrito anteriormente, en el apartado de tinción con H-E, se realizaron estudios histopatológicos de tumores de ratones C57BL/6 control no tratados, de ratones sometidos a irradiación sin previa inyección de FS y de ratones inyectados i.v. con: ZnPc, TMPyP o ZnPc + TMPyP y una sola ronda de TFD (300 J/cm²), a las 3 o 24 h después de dicha inyección. Las muestras se recogieron: 6, 24 y 72 h después de cada tratamiento.

En general, las secciones histológicas de 5 µm de espesor se desparafinaron toda la noche a 60 °C, se pasaron 15 min por Xilol, se hidrataron (absoluto, 96% y 70%) durante 5 min cada uno, se lavaron con agua destilada 5 min y se incubaron durante 5 min con 0.1% Tritón X-100 en PBS. Posteriormente, se incubaron durante 10 min con 10 µg/ml de Proteinasa K (Roche), según las instrucciones de la casa comercial, se lavaron 5 min con agua destilada y se pasaron 5 min por 0.1% Tritón X-100 en PBS. A continuación, se realizó el desenmascaramiento antigénico, sumergiendo las secciones en 0.1 M buffer citrato a pH 6 (0.25% de ácido cítrico y 0.038% de citrato sódico en agua) durante 5 min en el microondas a máxima potencia (650 W), se dejaron enfriar a temperatura ambiente 10 min y se lavaron 5 min en PBS. A continuación, se incubaron con cloruro amónico 50 mM durante 8 min a temperatura ambiente en una cámara húmeda, se incubaron 5 min con 0.1% Tritón X-100 en PBS y se llevó a cabo la incubación durante 1 h a 37 °C con los reactivos del kit comercial TUNEL (*In situ* cell death detection kit, Roche) (mezclando 45 µl TUNEL Label + 5 µl TUNEL Enzyme por muestra) en una cámara húmeda. En este punto, las muestras para inmunohistofluorescencia se lavaron con PBS (x3), se contratiñeron con H-33258 5 min y se montaron en ProLong Gold para su observación en microscopía de fluorescencia.

En el caso de las muestras para inmunohistoquímica, tras lavar con PBS, se incubaron con 0.1% Tritón X-100 en PBS 5 min (x2) y la inhibición de la peroxidasa endógena se llevó a cabo incubando 5 min con peróxido de hidrógeno (Panreac) al 3% en metanol (Panreac) a temperatura ambiente protegido de la luz, lavando después con PBS (x3).

A continuación, se incubaron las muestras durante 30 min a 37 °C con Converter-POD. Este Kit convierte la señal de FITC del ensayo TUNEL clásico, en un marcaje colorimétrico para observar las muestras en microscopía de campo claro. Este marcaje se consigue usando un anticuerpo anti-FITC unido al enzima peroxidasa (POD) que reconoce las roturas del DNA con FITC-dUTP. La

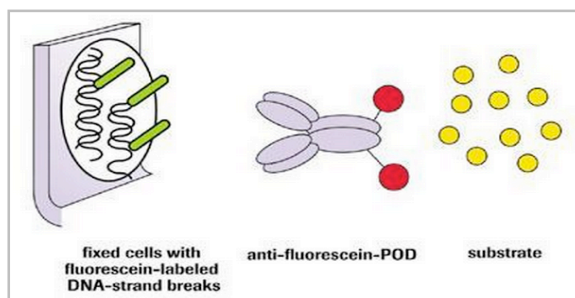


Figura 8. Esquema de las bases del ensayo TUNEL utilizando Converter-POD. Tomada de <http://www.roche-applied-science.com/shop/products/in-situ-cell-death-detection-kit-pod#tab-2>

señal de POD se revela utilizando un sustrato de esta enzima, por ejemplo la 3,3'-diaminobenzidina (DAB), que al oxidarse genera un precipitado marrón insoluble. A continuación, se lavaron con PBS (x3), y las secciones se revelaron incubándolas durante aproximadamente 5 min con una solución compuesta por DAB (Vector) al 0.05% en PBS y agua oxigenada (2 gotas). Finalmente, los cortes se lavaron con PBS y con agua destilada, se tiñeron 2 min con hematoxilina alumínica o de Harris (Panreac), se lavaron, se deshidrataron mediante pases rápidos en series crecientes de alcoholes, se pasaron por Xilol, se montaron en DePeX y se visualizaron en microscopía de campo claro.

○ Electroforesis de proteínas e inmunodetección (Western blot)

El nivel de expresión de la proteína poli-(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), fragmentada o no, se llevó a cabo mediante la técnica de Western Blot. Para ello, se utilizaron células sembradas en 12 F25: 3 controles sin irradiar, 3 para cada tratamiento fotodinámico con un sólo FS (5×10^{-8} M de ZnPc ó 10^{-6} M de TMPyP) y 3 con 5×10^{-8} M de ZnPc + 10^{-6} M de TMPyP. Transcurridas **6 h** después del correspondiente tratamiento, se realizó la extracción de proteínas. Para ello, se pusieron los F25 en hielo 5 min, se retiró el medio de cultivo y se lavaron 3 veces con 1ml de PBS frío. A continuación, se retiró el PBS y se añadió a cada F25, 500 µl de tampón de extracción filtrado (RIPA) [50 ml H₂O destilada con 50mM Tris-HCl a pH=8, 150 mM NaCl, 1% (v/v) Igepal CA630, todo de Sigma-Aldrich, y 0.1% (v/v) de SDS (dodecil sulfato sódico), complementado con una pastilla de inhibidores de proteasas de Roche]. Las células se levantaron mecánicamente (con un raspador) y se dejaron en hielo durante 30 min en agitación orbital. La solución de proteínas resultante se resuspendió con una jeringa y se dividió en dos eppendorfs de manera equitativa: uno para la determinación del contenido proteico de las muestras mediante el kit comercial por el método del ácido bicinonínico (BCA; Pierce, Rockford, USA), y el otro para realizar el western blot.

El kit del BCA consta de dos reactivos: el reactivo A (ácido bicinonínico, carbonato de sodio, bicarbonato sódico y tartrato de sodio en sosa 0.2 N), y el reactivo B (sulfato de cobre al 4%). Se mezclaron 24.5 ml del reactivo A con 0.5 ml del B. Después se añadieron 80 µl de RIPA y 900 µl de esta mezcla a cada 20 µl de muestra a analizar y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se paró la reacción en hielo y una vez a temperatura ambiente, se midió la absorbancia a $\lambda=562$ nm en el espectrofotómetro, utilizando una placa de 24 pocillos; como blanco se usó una muestra que sólo llevaba SDS. Se analizaron además soluciones de BSA (Pierce) de concentración conocida. A continuación, se determinó el contenido proteico interpolando los datos de una recta de regresión a partir de las concentraciones conocidas de BSA. Antes de cargar las muestras en el gel se añadió una quinta parte del volumen de la muestra de tampón de carga Laemli (Tris 1M, pH 6,8, SDS 2%, β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0.4%, vol/vol en H₂O), y se hirvió 2 minutos.

La carga y separación de proteínas se realizó mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida (Laboratorios Bio-Rad, Hercules, USA) con SDS (SDS-PAGE). Se preparó el gel concentrador al 4% y el separador al 15% de poliacrilamida, y se añadió tampón de corrida (100 ml de una solución madre 10X con 29 g de Tris Base y 145 g de glicina, mezclados con SDS al 0.1% hasta un litro en H₂O destilada). Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences, UK) empleando un equipo Mini-Protean 3, con los reactivos apropiados, según las instrucciones de uso (Bio-Rad). El gel se corrió a 80 V durante 20 min y posteriormente a 150 V durante aproximadamente 1 h.

Para la inmunodetección de proteínas la membrana fue bloqueada con tampón de saturación (TS) (PBS al 5% de leche en polvo y un 0.1% de TBS-Tween20), durante 1 h. Transcurrido ese tiempo, se lavó con tampón de lavado (TBS-Tween20) y se incubó utilizando un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti- β -actina (Sigma-Aldrich), diluido 1:5000 en TS, como control de carga, y un anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-PARP (Sigma-Aldrich), diluido 1:2000 en TS. La incubación se realizó durante toda la noche a 4 °C. El anticuerpo secundario anti-ratón (de oveja) conjugado con peroxidasa de rábano (en inglés *horseradish peroxidase* o *HRP*) (Amersham Biosciences) se diluyó 1:2000 en TS, y se incubó durante 90 min. Tras varios lavados con tampón de lavado, se incubó la membrana con luminol (Roche) 5 min y se revelaron las bandas en una película de rayos X Curix CP-G Plus (AGFA, Barcelona, España).

○ Inmunofluorescencias indirectas para proteínas implicadas en la apoptosis

Los efectos de los distintos tratamientos fotodinámicos también fueron analizados mediante inmunocitoquímica para:

- La proteína proapoptótica **Bax**, que se relocaliza desde el citosol hacia la mitocondria después de un estímulo apoptótico.
- El **citocromo c**, una proteína localizada en la membrana mitocondrial interna que se libera al citosol debido a la inducción de la formación de poros en la membrana mitocondrial externa por proteínas de la familia Bcl-2 (como Bax).
- La **golgina-130** (GM130), una proteína de la matriz de dicho orgánulo, que se utilizó para analizar la organización del aparato de Golgi después de los tratamientos fotodinámicos.
- Las **caspasas 2 y 3** en su forma activa. La caspasa-2 es una proteasa implicada en algunos procesos apoptóticos, actuando como iniciadora o efectora de la apoptosis en función de su localización. La función de la caspasa-3 ya ha sido comentada anteriormente. La activación de estas proteínas en respuesta a los distintos tratamientos fotodinámicos, se estudió utilizando un anticuerpo primario que únicamente reconoce su forma activa.

Para ello, las células control y tratadas se fijaron en formol-PBS (1:10) (v/v), durante 20 min a 4 °C y se lavaron con PBS 5 min (x3). A continuación, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 min y se incubaron 30 min con solución bloqueante (descrita anteriormente). Las muestras se incubaron en una cámara húmeda a 37 °C durante 1 h, con 25 μ l de la dilución correspondiente de anticuerpo primario en solución bloqueante (más detalles de los anticuerpos utilizados se especifican en la Tabla 2). Después, las muestras se lavaron con PBS (x3) y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 min. Posteriormente, se incubaron en una cámara húmeda a 37 °C durante 1 h con 25 μ l de la dilución correspondiente de anticuerpo secundario en solución bloqueante (ver Tabla 2). A continuación, las muestras se lavaron con PBS y se aclararon con H₂O destilada. La contratinción nuclear se realizó con H-33258, 5 μ l/ml en H₂O destilada, durante 3 min. Finalmente, las muestras se lavaron con H₂O destilada y se montaron en ProLong Gold. Las observaciones se realizaron al microscopio confocal de fluorescencia (ver apartado 19).

8. Análisis del citoesqueleto y de proteínas de adhesión celular

○ Inmuno fluorescencia indirecta para α -tubulina

La morfología de los microtúbulos (MTs) fue analizada mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina. Para ello, después de los diferentes tratamientos fotodinámicos, las células que habían crecido sobre cubreobjetos, se fijaron en metanol a -20 °C durante 5 min, se lavaron con H₂O destilada y con PBS. Posteriormente, se permeabilizaron con tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 0.5% durante 5 min y se incubaron con solución bloqueante (antes descrita) durante 30 min. Luego, las muestras se incubaron en una cámara húmeda a 37 °C durante 1 h con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti- α -tubulina (Sigma-Aldrich) a una concentración 1:100 en solución bloqueante. De nuevo se lavaron con PBS, se permeabilizaron con tritón X-100 al 0.5% y se incubaron 1 h en una cámara húmeda a 37 °C con el anticuerpo secundario policlonal anti-ratón (de cabra) conjugado con FITC (Sigma-Aldrich) a una concentración 1:100 en solución bloqueante. Finalizado el tiempo de incubación, los cubreobjetos se lavaron con PBS y se contratiñeron los núcleos con H-33258 (5 μ g/ml) durante 3 min. Finalmente, las muestras se lavaron con PBS y se montaron en ProLong Gold. Muestras con células de los correspondientes controles se procesaron de forma similar. Las observaciones se realizaron en microscopía confocal de fluorescencia (ver apartado 19).

○ Inmuno fluorescencia indirecta para vinculina o FAK y marcaje de actina-F

Para evaluar las alteraciones inducidas después de diferentes tratamientos de TFD en cultivos 2D (tanto apoptóticos como necróticos), se realizó un análisis de las proteínas de adhesión **vinculina** y **FAK fosforilada** (quinasa de adhesión focal) y de los microfilamentos de **actina-F** (abreviadamente: MFs), mediante inmunofluorescencia indirecta para vinculina o FAK y con faloidina conjugada con TRITC (isotiocianato de tetrametilrodamina), respectivamente. La faloidina es un compuesto de origen fúngico que se une a los MFs de actina y los estabiliza, lo que permite utilizar este compuesto conjugado con un fluorocromo, para estudiar la estructura de los MFs en microscopía de fluorescencia (ver Tabla 2).

Para ello, las células control y tratadas crecidas sobre cubreobjetos se fijaron en formol-PBS (1:10) durante 20 min, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 min. Posteriormente, se incubaron con solución bloqueante (antes descrita) durante 30 min y después con el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-vinculina (Sigma-Aldrich, 1:50 en solución bloqueante) o monoclonal de ratón purificado anti-FAK humana (pY397) (BD Biosciences, 1:50 en solución bloqueante), durante 1 h a 37 °C en una cámara húmeda. Las células se lavaron con PBS, se permeabilizan con Tritón X-100 al 0.5% en PBS durante 5 min, y después se incubaron, en ambos casos, con el anticuerpo secundario de cabra específico de IgG anti-ratón unido a FITC (Sigma-Aldrich, 1:50 en solución bloqueante) durante 1 h a 37 °C en una cámara húmeda. A continuación, se lavaron con PBS y se incubaron con faloidina-TRITC (Sigma-Aldrich, 1:200 en PBS), durante 30 min a 37 °C en una cámara húmeda. Posteriormente, se lavaron con PBS y se contratiñeron con 5 μ g/ml H-33258 durante 3 min. Finalmente, se volvieron a lavar con PBS y se montaron en ProLong Gold. Células de los correspondientes controles se procesaron de forma similar. Las muestras se observaron en un microscopio confocal de fluorescencia (ver apartado 19).

○ **Marcaje de actina-F en cultivos 3D de colágeno I y RAD16-I**

Matrices de **cultivos 3D** del péptido RAD16-I o de colágeno (muestras control, no tratadas con TFD), formadas sólo por células HeLa, sólo por células hNDF o cocultivos de ambas líneas celulares (50% HeLa + 50% hNDF), se fijaron en 1% paraformaldehído en PBS (peso/volumen) durante 2 h a temperatura ambiente. A continuación se lavaron 3 veces con PBS, se permeabilizaron con 0.1% Triton X-100 durante 30 min y se incubaron con faloidina-FITC para marcar así los MFs de actina-F, a una concentración de 1 mg/ml en PBS durante 30 min. Los núcleos se contratiñeron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI; Molecular Probes) 1 µg/ml durante 5 min, un fluorocromo que se une selectivamente al ADN bicatenario (se excita con luz ultravioleta y emite en la región azul). Por último, se lavaron las muestras 3 veces con PBS, se montaron en ProLong Gold y se visualizaron en un microscopio confocal de fluorescencia. De esta manera se puede realizar la **caracterización morfológica** de cada modelo 3D.

○ **Inmunofluorescencia directa para E-cadherina y vimentina en cultivos 3D (Matrigel™)**

Las matrices de cultivos 3D (de células MIA PaCa-2) en **Matrigel™**, se fijaron en 2% de formalina en PBS durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, se lavaron con PBS durante 5 min (3 veces), se permeabilizaron con Tritón X-100 (Sigma-Aldrich) al 0.1% durante 5 min a 37 °C y se añadió 0.1 M de glicina (Sigma-Aldrich) durante 5 min (3 veces). A continuación, se incubaron las muestras 30 min con solución bloqueante (DAKO) y luego toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios incluidos en el PathScan® EMT Duplex IF Kit Primary Antibody Cocktail, de la casa comercial Cell Signaling (MA, USA) (anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-E-cadherina conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor® 488; y el anticuerpo primario monoclonal de ratón anti-vimentina conjugado con el fluorocromo Alexa Fluor® 555, ambos a una dilución 1:100 en PBS). Al día siguiente, se lavaron las muestras 5 min con PBS (3 veces) y se montaron en ProLong Gold conteniendo DAPI. Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal de fluorescencia utilizando el objetivo x10.

Tabla 2. Resumen de los anticuerpos (Ab) más utilizados para los ensayos de inmunofluorescencia en cultivos 2D.

Antibodies used for Immunofluorescence assays (2D cultures)			
Primary Ab	Dilution	Company	Secondary Ab
Anti-Bax (mAb)	1:100	Santa Cruz	Mouse - FITC (1:100)
Anti-cytochrome c (mAb)	1:50	Invitrogen	Mouse - FITC (1:100)
Anti-GM130 (mAb)	1:100	BD Biosciences	Mouse - FITC (1:200)
Anti-active caspase-2 (pAb)	1:500	Santa Cruz	Goat - Texas Red (1:800)
Anti-active caspase-3 (mAb)	1:250	Sigma-Aldrich	Rabbit - TRITC (1:500)
Anti-α-tubulin (mAb)	1:100	Sigma-Aldrich	Mouse - FITC (1:100)
Anti-vinculin (mAb)	1:50	Sigma-Aldrich	Mouse - FITC (1:50)
Anti-FAK (mAb)	1:50	BD Biosciences	Mouse - FITC (1:50)

9. Análisis de la migración celular mediante el ensayo de “cierre de herida”

Para determinar si se producían cambios en el patrón de la migración celular después de diferentes tratamientos fotodinámicos, se realizaron ensayos de “curación o cierre de heridas” (en inglés: scratch wound assay). Para ello, se sembraron células HeLa en placas de 24 pocillos sin cubreobjetos y cuando las células alcanzaron una confluencia del 95%, se realizaron “heridas” en el cultivo usando una punta estéril. El medio de cultivo se cambió para eliminar los desechos de las células levantadas después de este procesamiento, y un área definida de la herida se fotografió a distintos intervalos de tiempo (durante un periodo total de 72 h), usando un microscopio invertido.

10. Cuantificación de la internalización (uptake) de diferentes compuestos

○ Py₃MeO-TBPO

La capacidad de acumulación del porfíriceno en el interior de las células HeLa se analizó por citometría de flujo. Los cultivos de células subconfluentes se incubaron con Py₃MeO-TBPO (0.5 μ M) en DMEM suplementado con un 1% de SFB durante: 1, 3, 6 y 18 h. Se evaluó que no se inducían alteraciones en la viabilidad o morfología de las células incubadas con el FS. Después de cada intervalo de tiempo, las células se lavaron tres veces con PBS, se tripsinizaron, se centrifugaron y se resuspendieron en PBS. La señal de emisión de fluorescencia se analizó con un citómetro de flujo (Gallios Beckman Coulter, CA, USA) equipado con un láser de excitación a 638 nm y la emisión de fluorescencia del porfíriceno se midió a partir de 656 nm (FL6). La intensidad de fluorescencia para cada tiempo de incubación se analizó en 10.000 células y el valor de fluorescencia por célula se determinó y se representó frente al número total de células. La muestra de células sin preincubar con el porfíriceno proporcionó el control negativo.

○ ZnPc y TMPyP

Como en el caso del Py₃MeO-TBPO, también llevó a cabo una determinación de la cantidad de ZnPc ó TMPyP que se había internalizado en células HeLa en cultivos en monocapa. Para ello, se incubaron las células (crecidas en F25, se usaron 6 replicas para cada protocolo), durante 1 h con ZnPc (5×10^{-8} M) y TMPyP (10^{-6} M). A continuación, las muestras se lavaron tres veces con PBS y se tripsinizaron. Una alícuota de células se utilizó para determinar el número total de células que había sembradas mediante un recuento en hemocitómetro. El resto de las suspensiones celulares se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min. Los sedimentos celulares se incubaron durante 2 h (en la oscuridad) con una solución de dodecil sulfato sódico (SDS) al 2% en agua destilada, con el fin de lisar las células y evaluar la incorporación de ambos FSs. Las concentraciones intracelulares de ZnPc y TMPyP se midieron utilizando un espectrofluorímetro Perkin-Elmer 650-10S (Waltham, USA). La concentración de FS en las muestras se calculó por interpolación en una recta de calibración obtenida con disoluciones de cada FS en SDS al 2%. Los resultados presentados son los valores medios de tres experimentos diferentes.

También se analizó la cantidad acumulada de los FSs (uptake) de la ZnPc (0.9 μ M/kg) y del TMPyP (3.6 μ M) por células HeLa, hNDF o cocultivos de ambas líneas celulares, tanto en cultivos 3D de colágeno I como de RAD16-I. Para ello, después de 3 h de incubación con los FSs -de manera individual o combinada- a 37 °C, se lavaron las matrices 5 min con PBS (3 veces). Posteriormente, las muestras de

RAD se incubaron 15 min con tripsina 0.5% y las de colágeno 15 min con colagenasa. Se detuvo la reacción con DMEM y se pipetearon las muestras 5 min para romper las matrices e individualizar las células. Finalmente, se centrifugaron 5 min a 1500 rpm, se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con DMEM (sin rojo fenol) para obtener por cada muestra 150 μ l de suspensión celular con una densidad de 1×10^6 células/ml. Las muestras se analizaron inmediatamente por citometría de flujo, midiendo la intensidad media de fluorescencia de emisión de la ZnPc y del TMPyP de manera separada.

○ TMPyP y MSNPs-TMPyP

Células HeLa previamente sembradas en frascos F25, fueron incubadas 18 h con TMPyP (libre e incorporado en MSNPs) a las siguientes concentraciones: 0.1, 0.5, 0.75 y 1 μ M. También se utilizaron células HeLa control (no tratadas). Posteriormente se lavaron las muestras con DMEM, se añadieron 400 μ l de tripsina (Gibco) y se dejaron 5 min en el incubador. A continuación, se paró la tripsinización con 600 μ l de DMEM y se centrifugaron las preparaciones en una centrífuga (P Selecta, Barcelona, Spain) durante 5 min a 1500 rpm. Finalizada la centrifugación, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el sedimento con 500 μ l de PBS y se volvió a centrifugar. Se repitieron de nuevo los pasos anteriores y se analizaron las muestras mediante un citómetro de flujo (Gallios Beckman-Coulter Inc.), equipado con un láser de excitación a 638 nm y la emisión de fluorescencia del TMPyP libre e incorporado en MSNPs se midió a partir de 656 nm (FL6).

11. Localización subcelular de los FSs

○ Py₃MeO-TBPO

La localización del porfíriceno se evaluó mediante microscopía de fluorescencia, en células HeLa sin fijar, incubadas durante 18 h con 0.5 y 0.75 μ M excitando con luz UV (el porfíriceno emite en el rango rojo del espectro). Para confirmar la localización intracelular del Py₃MeO-TBPO, se utilizaron dos sondas específicas de orgánulos:

- Los compartimentos ácidos de las células HeLa se marcaron incubándolas con la sonda **LysoTracker® Green DND-26** (LTG, 50 nM, Molecular Probes) en DMEM sin SFB durante 30 min a 37 °C.
- Las mitocondrias se marcaron con la sonda **MitoTracker® Green FM** (MTG, 200 nM, Molecular Probes) bajo las mismas condiciones.

Después de ambos marcajes, se lavaron las muestras con PBS y se observaron inmediatamente en microscopía de fluorescencia (ver apartado 19).

○ ZnPc y TMPyP

La localización de cada uno de estos FSs en el interior de las células HeLa crecidas sobre cubreobjetos, fue analizada por microscopía de fluorescencia después de una incubación durante 1 h con ZnPc (5×10^{-8} M) o con TMPyP (10^{-6} M), sin posterior irradiación. A continuación, se lavaron las muestras con PBS, se montaron en un portaobjetos con PBS y se observaron inmediatamente (con

excitación UV para la ZnPc y bajo excitación azul para el TMPyP). Además, se estudió la posible **relocalización** de ambos FSs a las 3 y 6 h después del tratamiento sinérgico.

Con el objetivo de identificar la localización subcelular de cada FS, se llevó a cabo una tinción específica del **aparato de Golgi** mediante **NBD-C₆-ceramida** (un marcador vital específico del aparato de Golgi)²⁰³ y un marcaje de los lisosomas con la sonda fluorescente **LysoTracker® Red DND-99**²⁰⁴, ambos productos de Molecular Probes. Las muestras se incubaron durante 30 minutos con NBD-C₆-ceramida (5 μ M en medio de cultivo). Posteriormente, se lavaron con PBS y se realizó una postincubación de 15 min en DMEM sin rojo fenol. A continuación, se observaron en microscopía de fluorescencia (ver apartado 19). Para el marcaje de los lisosomas, las células se incubaron a 37 °C con LysoTracker (50 nM en medio de cultivo) durante 30 min. A continuación, los cubreobjetos se lavaron con PBS y se observaron inmediatamente en microscopía de campo claro y de fluorescencia (ver apartado 19).

○ TMPyP y MSNPs-TMPyP

Células HeLa previamente sembradas en placas de 6 pocillos con cubreobjetos, fueron incubadas 18 h tanto con el TMPyP en forma libre, como vehiculizado en MSNPs a una concentración de 0.1 μ M en DMEM. Posteriormente, las muestras se lavaron tres veces con DMEM sin rojo fenol y sin fijar, las preparaciones se visualizaron, de manera inmediata, mediante microscopía óptica de fluorescencia (excitación azul).

12. Análisis de la respuesta a la tripsina

○ Py₃MeO-TBPO

El análisis de la posible pérdida de respuesta a la tripsina (con pérdida de la adhesión al sustrato), se evaluó en placas de plástico de 24 pocillos, inmediatamente y 24 h después finalizados, siguiendo las indicaciones descritas por Uzdensky *et al.*, con algunas modificaciones menores.²⁰⁵ Todas las muestras se procesaron bajo las mismas condiciones con el fin de reducir las variaciones entre los experimentos. Brevemente, inmediatamente después de los tratamientos fotodinámicos (incubación 18 h con el porfírico a 0.25, 0.5 o 0.75 μ M, seguida de irradiación roja 1.2, 2.4 ó 3.6 J/cm²), se retiró el medio de cultivo y se añadieron 0.2 ml de tripsina/EDTA (0.05%) a cada pocillo, durante 8 min a 37 °C en el incubador (tiempo óptimo de tratamiento con tripsina para lograr el desprendimiento de las células entre las muestras no tratadas con TFD). Después, se añadieron 0.3 ml de DMEM en cada pocillo, para detener la acción proteolítica de la tripsina. El número de células despegadas de cada pocillo se recontó por medio de un hemocitómetro. Con este protocolo, el 100% de las células de la muestra control (no tratadas) se encontraban individualizadas y flotando en el medio de cultivo. El efecto de la fotosensibilización fue cuantificado como la relación N/N_0 , donde N y N_0 corresponden al número de células despegadas del sustrato de cultivo en muestras de TFD y en muestras control, respectivamente.

○ **ZnPc + TMPyP**

La cuantificación de las células que se mantenían adheridas al sustrato después del tratamiento sinérgico, se evaluó en placas Petri de 35 mm de diámetro, tanto inmediatamente como 24 h después de la TFD.

Todas las muestras se procesaron del mismo modo con el fin de reducir las variaciones entre experimentos. Brevemente, inmediatamente después de los tratamientos fotodinámicos, se fotografiaron 20 campos aleatorios por muestra, utilizando un microscopio invertido con un objetivo X20 y se procedió al recuento de todas las células en cada imagen (1000 células evaluadas por muestra). Finalmente, se calculó el porcentaje de las células adheridas al sustrato 24 h después del tratamiento de TFD combinado y se expresó como porcentaje relativo al observado para las células control (no tratadas). Los valores se representan como la media \pm desviación estándar de cinco experimentos independientes.

13. Detección de las ROS generadas por el tratamiento fotodinámico sinérgico

La generación de especies reactivas del oxígeno **ROS** (reactive oxygen species) por parte del tratamiento combinado sinérgico, se analizó a los 30 min, 1 y 2 h después de finalizado, utilizando el ensayo del diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) (Sigma-Aldrich); utilizando como sustrato el DCFH-DA, el cual se oxida por las ROS generadas a DCF, que es altamente fluorescente, y por lo tanto se puede utilizar para detectar la formación intracelular de ROS. Después del tratamiento fotodinámico, las células se incubaron 30 min con 10 μ l de la sonda (500 μ M) en 490 μ l de DMEM. A los 15 min se añadieron 0.41 μ l de H-33258 2mM, se lavaron las muestras con DMEM y se visualizaron inmediatamente. La generación de ROS se detectó por el incremento en la intensidad de fluorescencia - con excitación azul en microscopía de fluorescencia. También se incubaron muestras de células HeLa control (no tratadas) como control negativo, así como, células HeLa incubadas 1 h con H₂O₂ (400 μ M) como control positivo. Asimismo, se analizaron muestras sólo incubadas con ZnPc o sólo con TMPyP e irradiadas. Además, los núcleos se contratiñeron con H-33258 según el protocolo explicado en apartados anteriores.

14. Evaluación de la estabilidad lisosomal

La permeabilización de la membrana de los lisosomas (lysosomal membrane permeabilization, LMP), se analizó 1 y 2 h después del tratamiento sinérgico, mediante una tinción con naranja de acridina (acridine orange, AO). Para ello, se incubaron las células, 5 min con 10 μ L de AO (10^{-3} M) en 1.5 ml de DMEM. Se realizaron varios lavados rápidos con PBS y se observaron al microscopio de fluorescencia bajo excitación azul.

15. Videomicroscopía

Los videos se llevaron a cabo en células HeLa control y tratadas durante 1 h con ZnPc (5×10^{-8} M) + TMPyP (10^{-6} M) + 2.4 o 3.6 J/cm² de irradiación roja, que fueron sembradas en cámaras de cultivo u-Slide con 8 pocillos especiales para su uso en microscopía de alta gama (Ibidi, Martinsried, Alemania). Las imágenes se capturaron en un microscopio DMI 6000B Leica equipado con una cámara digital R2

Orca (Hamamatsu, Japón) y un sistema de incubación con un controlador de CO₂ y temperatura (Okolab, Italia).

16. Detección de la localización de la ZnPc y el TMPyP en ratones portadores de tumores

Como modelos experimentales *in vivo*, se utilizaron hembras de la cepa de ratón C57BL/6 (18-20 g de peso corporal) obtenidas de Charles River (Como, Italia). Las células B78H1 fueron trasplantadas en el flanco derecho de los ratones mediante una inyección subcutánea de 100 μ l (10⁶ células) de una suspensión celular estéril en PBS. Transcurridos 15-20 días después del trasplante, cuando el diámetro externo del tumor se encontraba en el rango de 0.6-0.8 cm, se administraron por vía intravenosa (vena caudal de la cola de los ratones) la ZnPc (0.5 mg/kg) y el TMPyP (4.1 mg/kg). En los ratones control se inyectó PBS. Se utilizaron tres ratones para cada tiempo y modo de administración. La localización de cada FS se estudió 1, 3, 24, 48 y 72 h después de la correspondiente inyección, mediante un sistema de fluorescencia de imagen macroscópica Aequoria MDSTM, equipado con una cámara de conteo de fotones ARGUS (Hamamatsu, Japón) y los apropiados filtros de excitación (655 nm para ZnPc, y 475 nm para TMPyP). El procesamiento de imágenes y el análisis (IPA) se realizaron utilizando el programa de dominio público ImageJ 1.46 (Tabla Fire).

17. Farmacocinética de la ZnPc y el TMPyP en ratones portadores de tumores

La cinética de acumulación de ambos FSs (inyectados tanto de forma individual como de manera conjunta por vía i.v.), se realizó en el mismo modelo experimental descrito en el apartado anterior. Se utilizaron al menos 5 ratones por grupo y se recogieron muestras a: **1, 3, 24 y 96 h**, después de la inyección de cada FS. En el caso del estudio de la farmacocinética combinada (inyección simultánea de ZnPc y TMPyP), sólo se recogieron muestras a las 3 y 24 h después de la inyección ya que podían ser los intervalos de tiempo más interesantes.

Para estos estudios, se extrajeron diferentes órganos, se lavaron en suero fisiológico y se guardaron en eppendorfs a -20 °C hasta su posterior procesamiento. Las muestras analizadas fueron: suero sanguíneo, hígado, bazo, riñones, pulmones, piel de la zona de alrededor del tumor, cerebro y el tumor. La sangre se centrifugó 10 min a 3000 rpm, para obtener el suero sanguíneo que es la muestra que analizaremos (sobrenadante). Se pesaban unos 200 mg de cada órgano, se añadían 3 ml de SDS al 2% a cada muestra para homogeneizarlas. El homogeneizado se mantuvo durante 1 h a temperatura ambiente con agitación magnética suave, y después se procedió a diluirlas para medir la fluorescencia (para la ZnPc se diluyeron en cloroformo:metanol, y para el TMPyP en SDS 2%), excepto en el caso del suero que se diluyó en SDS al 2%, en ambos casos. Posteriormente, las muestras se centrifugaron 10 min a 3000 rpm y se tomó el sobrenadante. Para medir la intensidad de la fluorescencia de emisión de la **ZnPc** la muestra se excitó a 610 nm y se recogió la emisión en el intervalo espectral de 630-800 nm. Para el **TMPyP** la longitud de onda de excitación usada fue de 420 nm y se recogió la emisión de fluorescencia a 650-720 nm. Las intensidades de fluorescencia se transformaron en concentración de FS (expresada como nanomoles de FS por gramo de tejido) por interpolación en una curva de calibración.

18. Análisis de la respuesta a los tratamientos de TFD en ratones C57BL/6

El tratamiento de TFD realizado ha sido explicado anteriormente (apartado 4). Los intervalos de tiempo (3 y 24 h) seleccionados entre la administración y la exposición a la luz, se eligieron en base a los resultados previos obtenidos en los ensayos de localización tumoral y análisis de la farmacocinética de cada FS.

Los ratones utilizados se dividieron al azar en los siguientes grupos: **i)** Control absoluto (sin luz y sin FS), **ii)** Control en la oscuridad (inyección de cada FS solo o en combinación, pero sin posterior irradiación, **iii)** Control de luz (ratones irradiados con luz roja en ausencia de cualquier FS), **iv)** Ratones irradiados 3 o 24 h después de la inyección intravenosa de un FS, y **v)** Ratones irradiados 3 o 24 h después de la inyección intravenosa de los dos FSs, en las mismas condiciones experimentales. La eficacia del tratamiento se evaluó comparando la tasa de crecimiento del tumor en función del tiempo transcurrido, tanto en ratones tratados con TFD como en ratones control que no habían sido expuestos a la luz y no habían sido inyectados con FS. Se emplearon al menos seis ratones por grupo experimental.

El tamaño de los tumores se midió diariamente mediante un calibrador. Los volúmenes tumorales individuales (V) se calcularon suponiendo una estructura hemielipsoidal para el nódulo tumoral, midiendo los dos ejes perpendiculares (a y b) y la altura (c). El volumen total del tumor se obtuvo aplicando la fórmula: $V = 2/3\pi (a/2 \times b/2 \times c)$. Los ratones fueron observados diariamente para determinar la fecha en que los diámetros de los tumores equivalían o excedía el volumen del tumor de $\geq 1 \text{ cm}^3$. Llegado ese momento, los ratones fueron sacrificados por eutanasia de acuerdo con las reglas establecidas por el Comité Ético de la Universidad de Padua para la investigación con animales de experimentación.

19. Microscopía óptica

Para la observación rutinaria de los cultivos celulares durante su mantenimiento, así como a lo largo y después de los distintos tratamientos, se utilizó un microscopio invertido Olympus CKX31 (Tokio, Japón).

Las muestras procesadas para microscopía óptica (campo claro y fluorescencia) se visualizaron y fotografiaron en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX61, equipado con una lámpara de mercurio HBO de 100 W y los correspondientes filtros de excitación: ultravioleta (365-390 nm), azul (460-490 nm) y verde (510-550 nm). Las imágenes se obtuvieron con una cámara digital Olympus DP50, acoplada al microscopio y se procesaron con el programa Photoshop CS5 (sistemas Adobe, San Jose, USA).

También, se utilizó un microscopio confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Heerbrugg, Suiza) provisto de los siguientes láseres: 405 nm (Argón-UV), 488 nm (Argón), y 561 nm (DPSS).

Además, se obtuvieron imágenes de células vivas bajo contraste de interferencia diferencial (DIC) con un microscopio invertido (Leica DMI6000B) equipado con una cámara digital Leica DFC420 C.

20. Estadística

Se llevaron a cabo diversos análisis estadísticos. Los datos representados de los resultados obtenidos en los ensayos del MTT, corresponden a los valores medios \pm desviación estándar, de al

menos seis experimentos diferentes. Para los cultivos 2D, las diferencias estadísticamente significativas se etiquetaron como * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ ó **** $P < 0.0001$, para las comparaciones realizadas entre grupos mediante un ANOVA de una vía con el test post-hoc de comparación múltiple de Tukey.

En el caso de los análisis estadísticos realizados en cultivos 3D, todos los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. Se utilizó la prueba t de Student para datos independientes para poner a prueba el nivel de significación entre dos conjuntos de mediciones. El nivel de significación se fijó en $P < 0.05$.

En los resultados obtenidos en los estudios realizados *in vivo*, se empleó la prueba t de Student para datos independientes, y las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se compararon con la prueba de log-rank.

Todos estos análisis se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, CA, USA).

RESULTADOS

*“Un científico debe tomarse la libertad de plantear
cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación,
de corregir errores”*

Julius Robert Oppenheimer (1904-1967)



1. Ensayos realizados in vitro en cultivos celulares 2D

1A. Caracterización fotobiológica del porficceno $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$

El presente estudio se llevó a cabo para analizar las propiedades fotobiológicas en cultivos celulares de un nuevo porficceno, sintetizado por el grupo de Ingeniería Molecular del Dr. Nonell, del Institut Químic de Sarrià (Universitat Ramon Llull, Barcelona). Concretamente, el porficceno tricatiónico 2,7,12-tris(α -piridinio-*p*-tolil)-17-(*p*-(metoximetil)fenil) ($\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$). Todos los estudios se realizaron en células HeLa.

1A.1 Análisis de la acumulación intracelular y de la localización subcelular

La Figura 1 muestra el grado de **acumulación** (uptake) en el interior de las células HeLa, en relación al tiempo de incubación de la células con el porficceno, a una concentración fija de $0.5 \mu\text{M}$. Los resultados obtenidos por citometría de flujo (aprovechando las propiedades fluorescentes del mismo), demostraron que la internalización del $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ por las células HeLa, era dependiente del tiempo de incubación. La mayor acumulación se obtuvo después de 18 h de incubación, cuando el valor medio de fluorescencia fue aproximadamente 3 veces mayor que el de las muestras incubadas sólo 1 h.

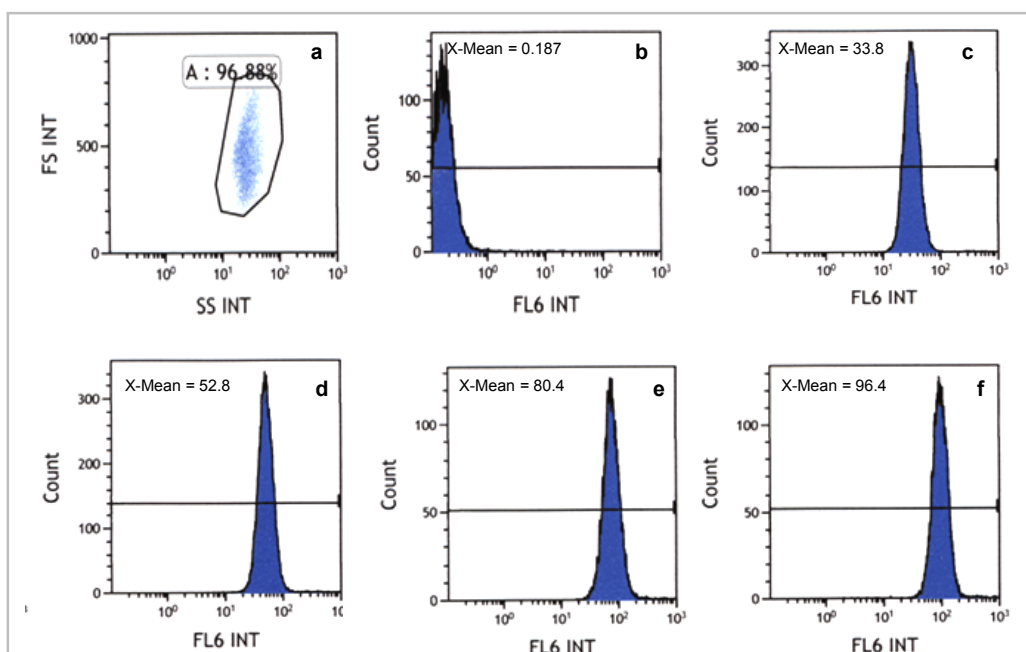


Figura 1. Acumulación intracelular de $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ en función del tiempo de incubación, analizada por citometría de flujo. **a)** La media de la fluorescencia del canal se midió en la población que representa las células control. **b-f)** Histogramas de citometría de flujo de células control (b) e incubadas con $0.5 \mu\text{M}$ $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ durante 1 h (c), 3 h (d), 6 h (e) y 18 h (f), respectivamente.

La **localización** celular se analizó mediante microscopía de fluorescencia, aprovechando la emisión roja del porficceno con excitación UV. La Figura 2a muestra como bajo excitación UV, las células HeLa incubadas con $0.5 \mu\text{M}$ de $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ durante 18 h, presentaban una fluorescencia roja punteada dispersa por el citoplasma, correspondiente a la emisión del FS. Asimismo, se podía visualizar la autofluorescencia azul de las mitocondrias. En la Figura 2b, se observa la fluorescencia de las células

incubadas 18 h con 0.5 μM de $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ y postincubadas con la sonda LysoTracker® Green DND-26 (LTG), mostrando la característica fluorescencia verde de los lisosomas. Cuando se superpusieron ambas imágenes, la distribución intracelular puntiforme del porfíriceno catiónico se superponía, en gran parte, con la fluorescencia de la sonda LTG, lo que demostraba una localización del FS en los lisosomas. Por el contrario, no se detectó ninguna colocalización del porfíriceno con el marcador mitocondrial MTG (imágenes no mostradas).

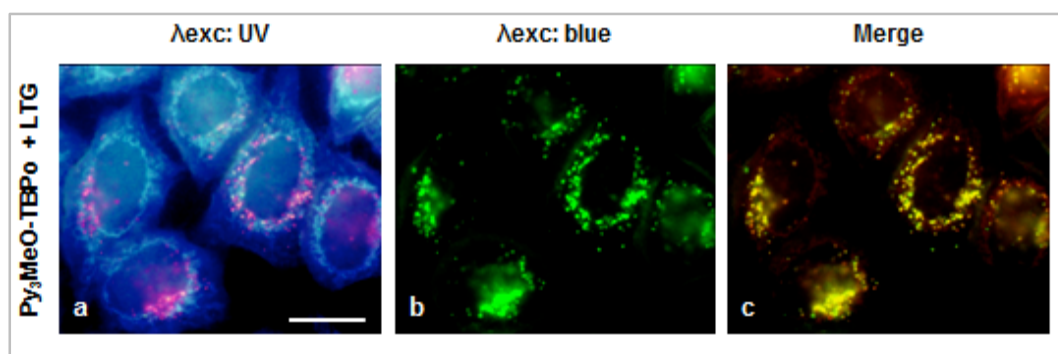


Figura 2. a) Imágenes de fluorescencia de células HeLa que muestran la localización del $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ bajo excitación UV. b) Fluorescencia del LTG. c) Superposición de las imágenes. Barra de escala: 10 μm .

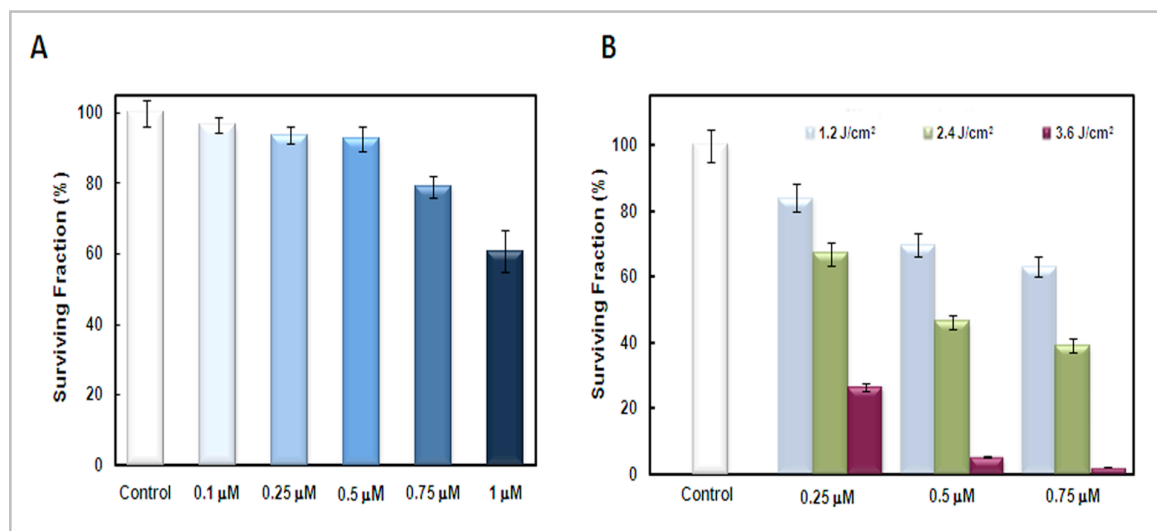
1A.2 Toxicidad en la oscuridad, fototoxicidad y efecto de la TFD en la tripsinización

Después de los estudios de localización, se evaluó la posible toxicidad inducida por el propio FS (**toxicidad en la oscuridad**). Para ello se analizó el efecto en la supervivencia celular del $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ a diferentes concentraciones (0.1-1 μM), con un tiempo de incubación de 18 h pero sin irradiación (ver Fig. 3A). La toxicidad se evaluó mediante el ensayo colorimétrico del MTT. Los resultados obtenidos indicaron que la supervivencia fue mayor del 90% para concentraciones \leq a 0.5 μM , aunque, cuando la concentración se incrementó a 0.75 μM se detectó un ligero aumento de la citotoxicidad. Por el contrario, una incubación de 18 h con 1 μM indujo un porcentaje significativo de células no viables y, por lo tanto, esta concentración se descartó para los siguientes experimentos.

Por otra parte, dado que la incubación de las células HeLa con el FS se realizó en medio de cultivo con un 1% de suero fetal bovino (SFB), también se evaluó la eventual toxicidad inducida por los niveles bajos de suero. Para ello, se comparó la viabilidad celular después de 18 h de incubación con medio (sin porfíriceno) que contenía un 1% ó un 10% de SFB. Los resultados obtenidos ($99\% \pm 3$ para el 1% vs $100\% \pm 4$ para el 10%) demostraron que la viabilidad celular no se veía afectada por la reducción de la concentración de SFB en el medio de cultivo. Además, no se detectó ninguna alteración en la morfología celular, que pudiera sugerir la inducción de un proceso de autofagia o apoptosis por la reducción de SFB.

La Figura 3B muestra los cambios en la **viabilidad celular** inducidos por el FS a diferentes concentraciones y dosis de luz, evaluados mediante el ensayo del MTT. La fracción viable de células HeLa que fueron expuestas a la luz sin preincubación con $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$, fue similar a la de los controles (datos no mostrados). La dosis de luz más baja (1.2 J/cm^2) causó daños leves, incluso a la concentración ensayada más elevada. Al incrementar la dosis de luz a 2.4 J/cm^2 , se logró una letalidad superior al 50%. Sin embargo, se detectó una viabilidad celular inferior al 10% cuando se utilizó el porfíriceno a una

concentración de 0.5 μM con la dosis máxima de luz (3.6 J/cm^2), mientras que los tratamientos con 0.75 μM + 3.6 J/cm^2 inducían un efecto letal. El equilibrio entre la toxicidad en la oscuridad y el daño inducido después de la irradiación, sugirió que 0.5 ó 0.75 μM de FS y 3.6 J/cm^2 eran unas condiciones adecuadas para los estudios de TFD, por lo que todos los posteriores protocolos experimentales se llevaron a cabo utilizando ambas concentraciones de $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$.



Con el fin de confirmar los resultados obtenidos con el ensayo del MTT, también se llevó a cabo un ensayo de citotoxicidad con el colorante vital **azul tripán** *in situ* (directamente en los pocillos de plástico, sin tripsinizar las células), 3 y 24 h después de los tratamientos fotodinámicos.

Como se muestra en la Figura 4, las células HeLa incubadas 18 h con $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ (0.75 μM) e irradiadas, estaban teñidas de azul (muertas). Resultados similares se obtuvieron incubando las células con 0.5 μM de $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ durante 18 h y sometidas a irradiación. Sin embargo, las células después

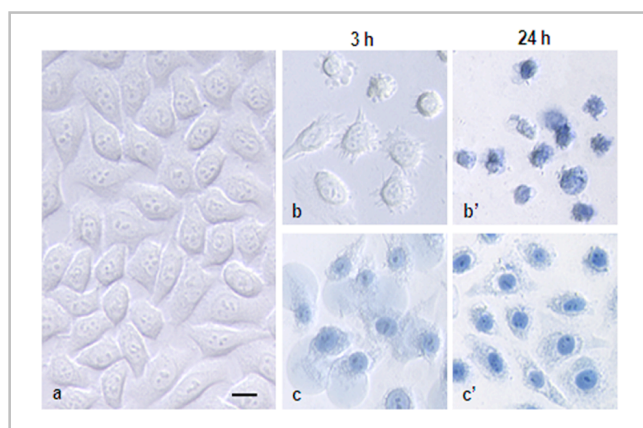


Figura 4. Imágenes de las células HeLa teñidas *in situ* con azul tripán. **a)** Células control (viables). **b-b')** Células 3 y 24 h después del tratamiento con $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ (0.5 μM) durante 18 horas, seguido de la irradiación de 3.6 J/cm^2 , respectivamente.

de este protocolo mostraban alteraciones morfológicas (como se describe posteriormente), y a las 3 h del tratamiento mantenían la integridad de la membrana plasmática. Sin embargo, 24 h después, las células ya eran permeables al azul tripán.

Asimismo, durante el desarrollo de esta investigación, también pudimos comprobar que la fotosensibilización inducida por $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ aumentaba la **resistencia** de las células **al tratamiento con tripsina**, es decir, las células HeLa fotosensibilizadas no respondían a la incubación con tripsina, con una pérdida de adhesión (ver Fig. 5). Sólo una pequeña fracción de las células tratadas perdía la adhesión al sustrato de cultivo, después de la irradiación. En este sentido, comprobamos que este efecto era dependiente de la concentración y la dosis de luz. Al comparar estos resultados con los obtenidos por el ensayo del MTT, se pudo detectar que los tratamientos fotodinámicos inducían resistencia de las células a la tripsinización, incluso en el caso de los tratamientos fotodinámicos subletales.

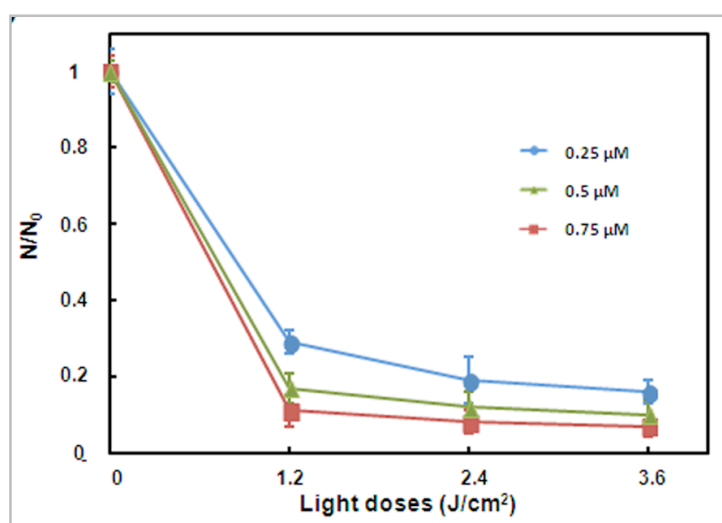


Figura 5. Eficiencia de tripsinización (N/N_0) inmediatamente después de los tratamientos fotodinámicos (N , número de células tratadas despegadas y N_0 número de células control despegadas).

1A.3 Evaluación de los mecanismos de muerte celular

Para la identificación de las células apoptóticas y necróticas se utilizaron **criterios morfológicos** bien establecidos, evaluados mediante la tinción con rojo neutro (NR), para el análisis de la morfología general, y con Hoechst-33258 (H-33258) para la visualización de la cromatina.

El panel A de la Figura 6 muestra los efectos de la incubación con $0.5 \mu\text{M}$ $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ durante 18 h, seguido de una dosis de luz de 3.6 J/cm^2 . Como se puede observar, **3 h** después del tratamiento, se detectó un porcentaje apreciable de células que presentaban, reducción del volumen celular, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear, todas ellas características morfológicas de una muerte apoptótica.

A las **6 h** y **24 h** la mayoría de las células ya mostraban una clara morfología apoptótica y sólo una pequeña fracción de células presentaba una morfología necrótica. Asimismo, un muy escaso porcentaje de células no mostraba una morfología alterada.

Del mismo modo, se observó una evolución morfológica típica de la necrosis, cuando la concentración de $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ se incrementó a $0.75 \mu\text{M}$. Inmediatamente después de la irradiación y 1 h después, se formaba una “burbuja” de gran tamaño en la membrana plasmática, observable en el microscopio invertido (ver Fig. 6B-b). Además, se detectó una condensación uniforme de la cromatina. A las 6 h del tratamiento, la burbuja gigante mencionada, se rompía y sólo se encontraron restos de citoplasma adheridos al sustrato de cultivo (ver Fig. 6B-c).

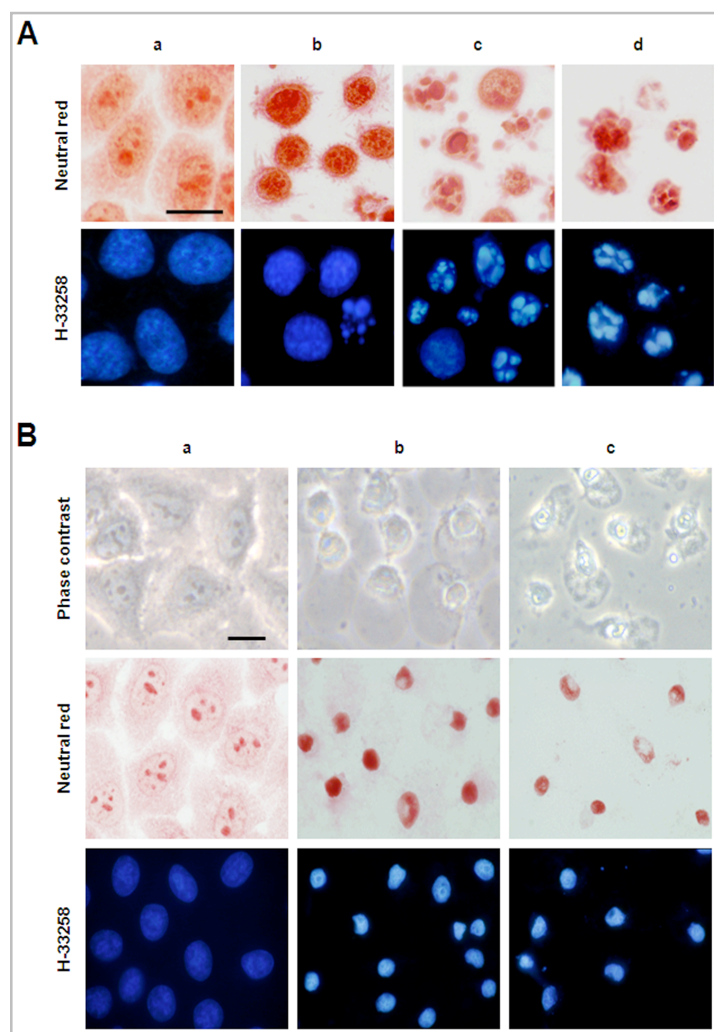


Figura 6. A: Morfología de las células HeLa teñidas con NR o H-33258. **a)** Células no tratadas (control). **b-d)** Células incubadas con $0.5 \mu\text{M}$ $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ 18 h seguido de irradiación con luz roja (3.6 J/cm^2) observadas 3, 6 y 24 h más tarde, respectivamente. **B:** Cambios morfológicos de las células incubadas con $0.75 \mu\text{M}$ $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ 18 h y sometidas a irradiación con luz roja (3.6 J/cm^2), visualizadas por microscopía de contraste de fase, tinción con NR o H-33258. **a)** Células control. **b-c)** Células 1 y 6 h después del tratamiento, respectivamente. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$.

Mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta, se observó la **relocalización de la proteína proapoptótica Bax**, desde el citosol a la mitocondria. Como se muestra en la Figura 7A-a, las células control (no tratadas), mostraban una fluorescencia citoplasmática verde difusa. Por el contrario, **3, 6 y 24 h** después del tratamiento fotodinámico, las células evidenciaban una intensa fluorescencia verde en las mitocondrias. La contratinción con H-33258 permitió la caracterización morfológica de la apoptosis (cromatina condensada y fragmentada). Posteriormente, se realizó un **recuento** de las células con la proteína Bax relocalizada en tres intervalos diferentes: 3, 6 y 24 h después del tratamiento (ver Fig. 7C). El aumento en el % de células apoptóticas fue consistente con la evolución en el tiempo, alcanzando un valor máximo del 70% a las 24 h del tratamiento. Curiosamente, algunas células mostraron relocalización de Bax pero núcleos no fragmentados (Fig. 7B), lo que permitió evidenciar que, la relocalización de Bax hacia la mitocondria precedía a la fragmentación nuclear.

Para corroborar la muerte celular por apoptosis, se efectuó un **ensayo TUNEL** a distintos intervalos de tiempo después del tratamiento fotodinámico descrito anteriormente. La Figura 7D muestra como 6 h después de la irradiación, sólo las células en las que se había inducido la apoptosis, mostraban una fluorescencia verde positiva de este ensayo, mientras que las células viables no mostraron emisión de fluorescencia verde.

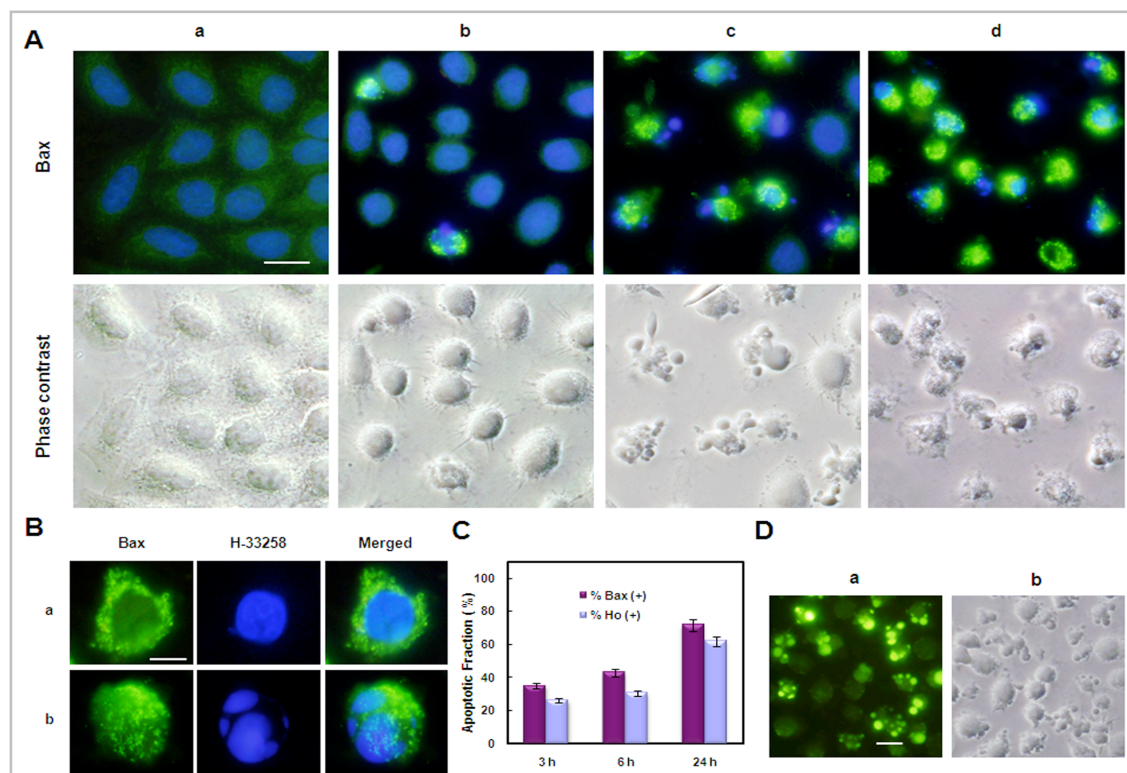


Figura 7. Identificación de la apoptosis después del tratamiento (18 h con 0.5 µM de $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ + 3.6 J/cm²). **A:** Inmunofluorescencia de Bax (verde) en células contrateñidas con H-33258 (azul) (panel superior). Las mismas células visualizadas en microscopía de contraste de fase (panel inferior). **a)** Células control con señal difusa de Bax. **b-d)** Células 3, 6 y 24 h después del tratamiento fotodinámico, respectivamente. **B:** Señal del patrón mitocondrial de Bax en las células HeLa con cromatina condensada (**a**), y con cromatina fragmentada (**b**) 6 h después de la TFD. Barra de escala: 5µm. **C:** Porcentaje de células con la proteína Bax relocalizada a las mitocondrias (columna oscura) o núcleo fragmentado (columna clara) 3, 6 y 24 h después del tratamiento. Los valores representan la media ± desviación estándar, de tres recuentos independientes. **D:** Células apoptóticas a las 6 h del tratamiento evaluadas mediante el ensayo TUNEL. **a)** El punteado nuclear verde fluorescente representa células TUNEL-positivas. **b)** Las mismas células visualizadas por microscopía de campo claro. Barra de escala: 10 µm.

A continuación y mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta, se observó que el **citocromo c** continuaba localizado en las mitocondrias poco después del tratamiento con 0.5 µM. Sin embargo, 3 h después de la TFD, una fracción significativa de células mostraban unas mitocondrias con forma esférica dispuestas alrededor del núcleo, pero el citocromo c aún no había sido liberado, atendiendo al patrón de fluorescencia (ver Fig. 8b-e). Sin embargo, 6 h después de la irradiación, la mayoría de las células mostró una fluorescencia difusa y la cromatina fragmentada (ver Fig. 8f-i). Asimismo se observó en microscopía de contraste de fase, el típico “burbujeo” de la membrana plasmática que se produce durante la apoptosis. De esta manera, comprobamos que el tratamiento con $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ (0.5 µM) durante 18 horas, seguido de irradiación de 3.6 J/cm², inducía una masiva muerte celular por apoptosis

(70% de las células), mientras que una concentración de 0.75 μM producía un efecto letal, pero asociado a una predominante muerte por necrosis.

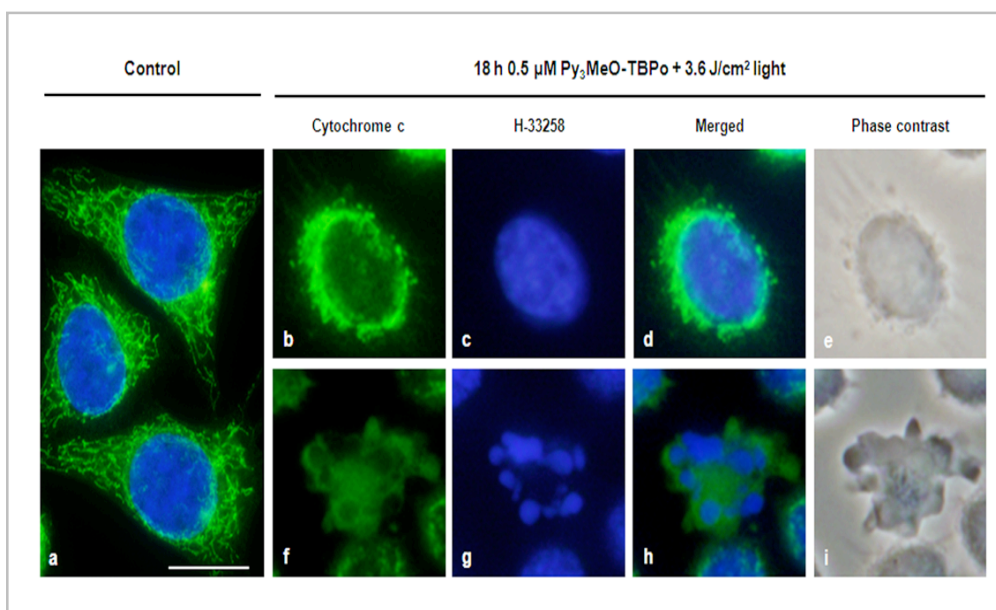


Figura 8. Efecto del tratamiento con 0.5 μM Py₃MeO-TBPO 18 h + 3.6 J/cm² de luz, sobre la distribución celular del citocromo c detectado por inmunofluorescencia indirecta (verde) y contratinción de la cromatina con H-33258 (azul). **a)** Células no tratadas. **b-e)** Células HeLa 3 h después de la TFD. **f-i)** Liberación del citocromo c al citoplasma de las células que muestran cromatina fragmentada 6 h después de la irradiación. Barra de escala: 10 μm .

1A.4 Alteraciones del citoesqueleto

Los resultados del análisis de la **morfología de los MTs** mediante inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina, se muestran en la Figura 9. Las células HeLa control en interfase presentaban una red radial de MTs, distribuidos por toda la célula (Fig. 9a). La figura 9b-d muestra el aumento de las alteraciones en los MTs después del tratamiento apoptótico (a diferentes intervalos de tiempo). Después de 3 h las células eran todavía tubulina-positivas, pero ya mostraron una reducción en el volumen celular. Seis y especialmente 24 h después del tratamiento, la mayoría de las células eran tubulina-negativas y mostraron núcleos fragmentados. Por el contrario, todas las células presentaron MTs dañados y desorganizados 3 h después del tratamiento necrótico. Sólo una fluorescencia muy escasa y difusa de color verde se observó en el citoplasma (fig. 9b'). Como se muestra en las figuras 9c' y d', se obtuvieron imágenes similares a las 6 y 24 h después del tratamiento necrótico.

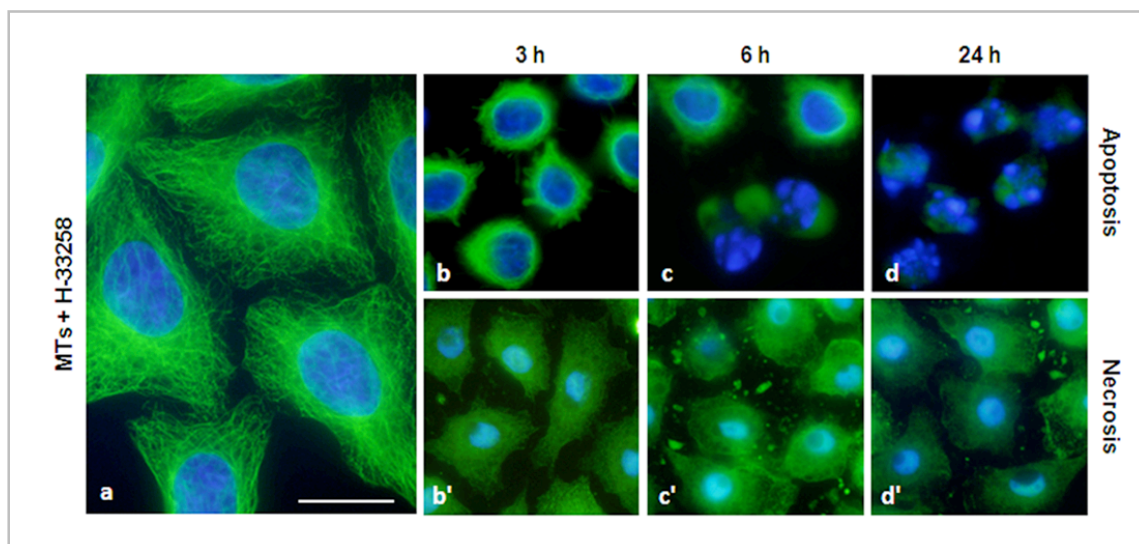


Figura 9. Inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina y contratinción con H-33258. **a)** Células control. **b-d)** Células 3, 6 y 24 h después del tratamiento apoptótico (18 h de incubación con 0.5 μ M $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ seguido por 3.6 J/cm^2 de irradiación con luz roja), respectivamente. **b'-d')** Células 3, 6 y 24 h después del tratamiento necrótico (18 h de incubación con 0.75 μ M $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ + 3.6 J/cm^2 irradiación), respectivamente. Barra de escala: 10 μ m.

Por otro lado, investigamos los efectos de la TFD con el porfírico catiónico sobre los **MFs de actina** y la proteína **vinculina**, implicados en la adhesión celular. Las figuras 10B y C muestran la secuencia de eventos relacionados con las alteraciones inducidas en dichos componentes celulares debido a la muerte celular apoptótica o necrótica. El tratamiento apoptótico indujo una serie de cambios que se pueden dividir en 3 etapas y corroboraron los resultados obtenidos por otros ensayos de apoptosis (análisis morfológico, Bax, citocromo c y TUNEL). Las células 3 h después de la irradiación se redondearon y mostraron una clara retracción, manteniendo largas extensiones, como filopodios, que contenían F-actina. La proteína vinculina estaba mucho menos expresada que con respecto a las células control, pero todavía había pequeños puntos de color verde brillante, responsables del mantenimiento de la adhesión celular. Durante la segunda fase se detectó (6 h después de la irradiación), una clara reducción en la expresión de vinculina y F-actina en las células con la cromatina apoptótica y burbujas en la membrana plasmática. Sorprendentemente, 24 h después del tratamiento apoptótico, la vinculina se detectó como una débil señal fluorescente entre los restos celulares. Por el contrario, el tratamiento necrótico indujo un rápido daño celular que impidió el desensamblaje de la vinculina de la membrana plasmática, y esta proteína mostró una distribución similar a la de las células control. Sin embargo, como en el caso de los MTs, los cambios inducidos por este tratamiento eran mucho más drásticos y dieron lugar a una desorganización rápida y progresiva de la F-actina. Cabe resaltar que el tratamiento con ya sea solo porfírico o solo con luz roja no indujo cambios en la reactividad, distribución o morfología de los MTs, MFs de actina o la proteína vinculina (Fig. 11).

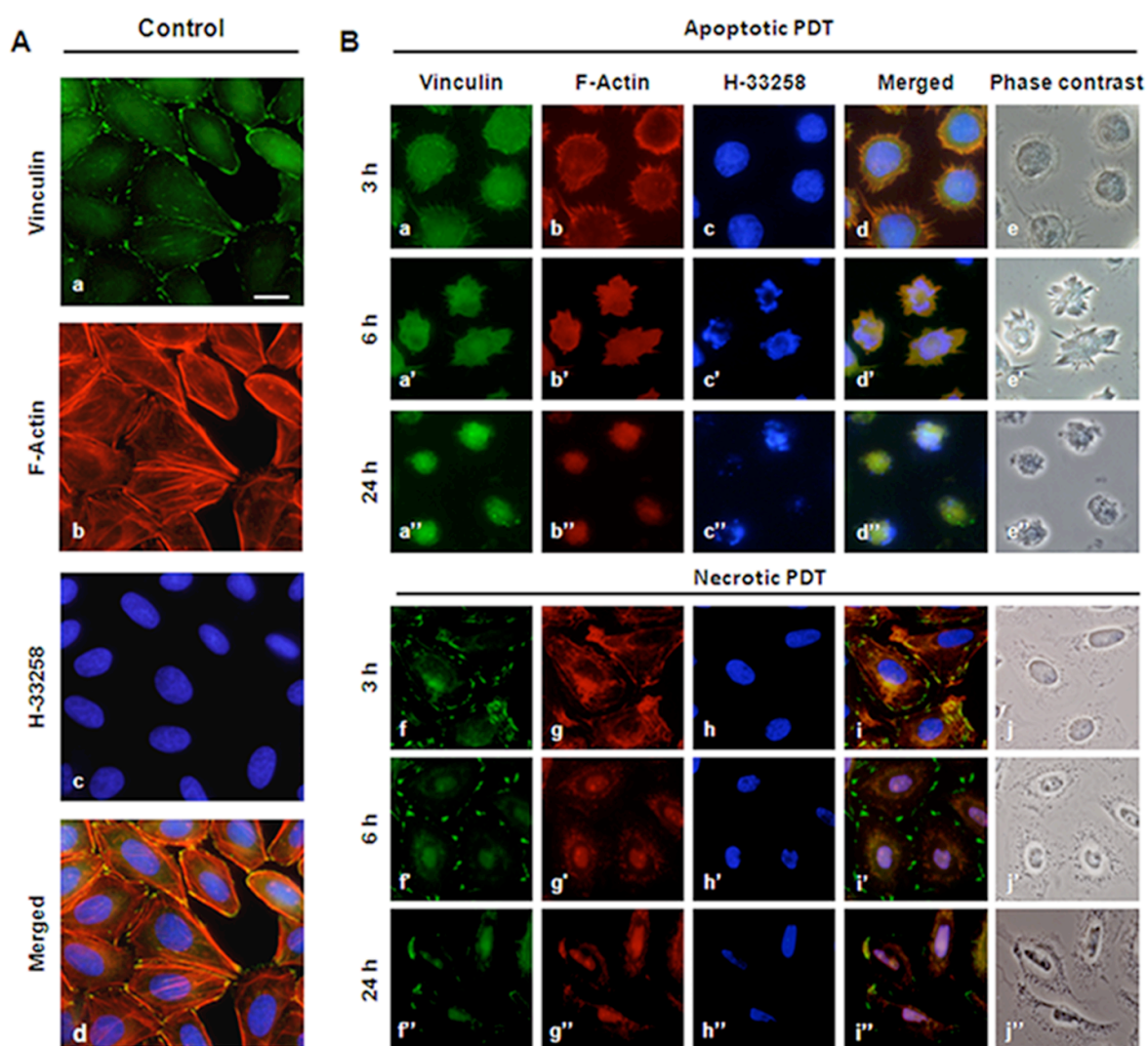


Figura 10. Células HeLa después del tratamiento apoptótico y necrótico observadas por microscopía de fluorescencia y contraste de fase. Inmufluorescencia de vinculina (verde), visualización de F-actina marcada con faloidina-TRITC (rojo) y tinción del ADN con H-33258 (azul). **A:** Células control. **B:** (a-e), (a'-e'), y (a''-e'') Células 3, 6 y 24 h después del tratamiento apoptótico, respectivamente. (f-j), (f'-j'), y (f''-j'') Células 3, 6, y 24 h después del tratamiento necrótico, respectivamente. Barra de escala: 10 μ m.

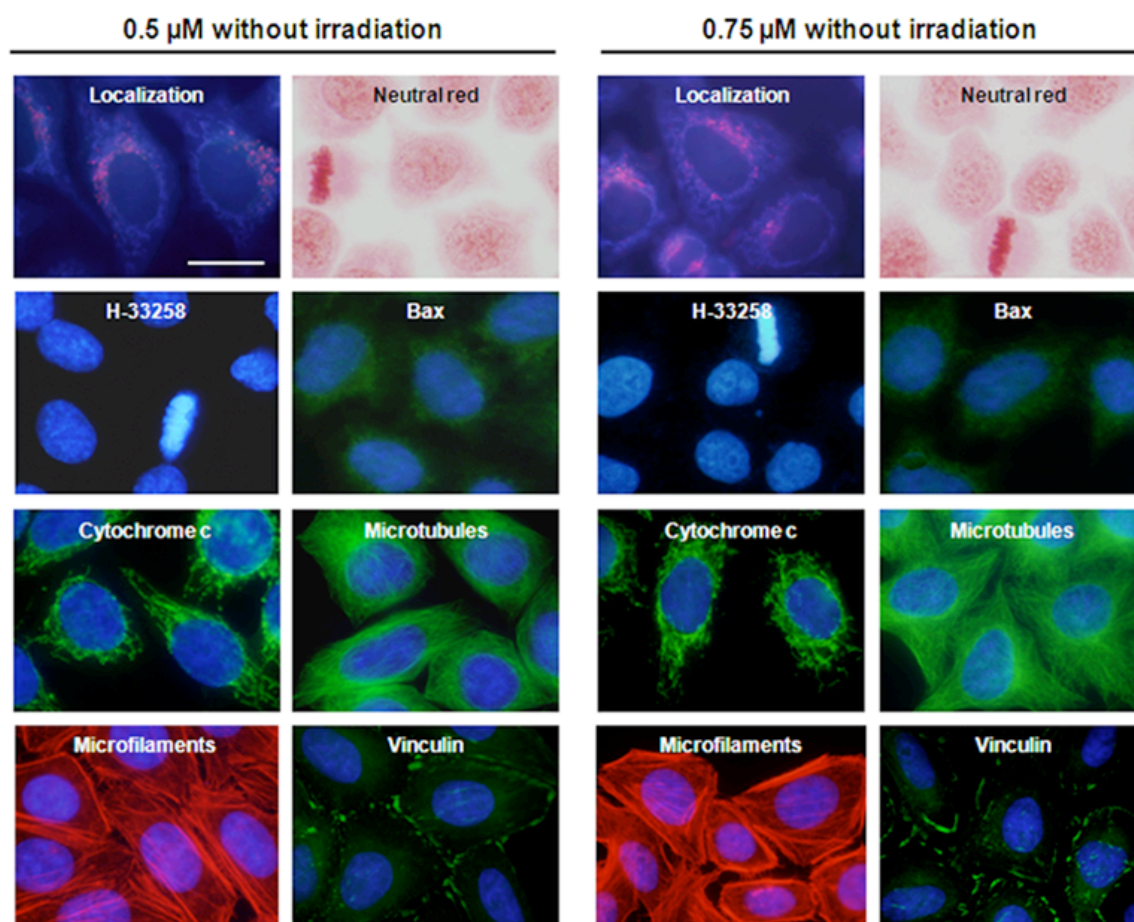


Figura 11. Imágenes representativas de las células HeLa incubadas 18 h con $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ (0.5 ó 0.75 μM) pero no irradiadas, siguiendo diferentes técnicas experimentales. Se obtuvieron resultados similares a los de las células control (no preincubadas con $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ y no irradiadas), a excepción de la observación de la fluorescencia roja del $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ en el caso del análisis de la localización subcelular. Barra de escala: 10 μm .

1. Ensayos realizados *in vitro* en cultivos celulares 2D

1B. Evaluación del efecto inducido por la combinación de ZnPc + TMPyP

Este apartado de resultados (1B) se ha subdividido en diferentes secciones con el fin de agrupar de manera coherente los objetivos a analizar.

1B.1 Evaluación del efecto combinado de la TFD sobre la viabilidad celular

La supervivencia celular de los tratamientos fotodinámicos en las líneas celulares utilizadas (HeLa, HaCaT y MCF-7), se determinó 24 y 48 h después de finalizar los mismos, mediante el ensayo colorimétrico del MTT.

El análisis mostró que la incubación durante 1 h con **ZnPc (5×10^{-8} M) + TMPyP (10^{-6} M)**, seguida de irradiación con luz roja de 4 mW/cm^2 (dosis de luz 2.4 J/cm^2), inducía 24 h después del tratamiento, un efecto prácticamente letal en los cultivos de las células HeLa, ya que la supervivencia celular se reducía a un $3 \pm 1\%$ (ver Fig. 1A). El efecto observado se mantenía a las 48 h después del tratamiento (ver Fig. 1B).

El análisis del efecto fototóxico del mismo protocolo fotodinámico, también se llevó a cabo en las líneas celulares HaCaT y MCF-7. Los resultados obtenidos indicaban que la incubación conjunta con los dos FSs, seguida de una irradiación de 2.4 J/cm^2 , producía efectos altamente significativos sobre la supervivencia de las tres líneas celulares utilizadas. Los datos representados corresponden a los valores medios \pm DE (desviación estándar) de al menos seis experimentos diferentes.

Además de la dosis de irradiación de 2.4 J/cm^2 , se probaron en las 3 líneas celulares, dosis de luz roja superiores (3.6 J/cm^2). Los resultados obtenidos indicaron un efecto fotocitotóxico incrementado cuando los 2 FSs fueron administrados simultáneamente.

Por el contrario, los tratamientos fotodinámicos con un sólo FS no afectaban significativamente la viabilidad de las células HeLa y HaCaT. Sólo la ZnPc mostró un pequeño grado de fototoxicidad ($13 \pm 4\%$ y $20 \pm 3\%$, respectivamente), pero a las 48 h la supervivencia celular incrementó a valores superiores al 90%. Por otro lado, las células MCF-7 mostraron un mayor grado de fotosensibilización a las 24 h después de los tratamientos, pero es importante señalar que los valores de supervivencia alcanzaron valores similares a los de las células control en el caso de los protocolos individuales, pero no en el tratamiento combinado, lo que confirmaba la alta eficiencia de la estrategia combinada.

Las diferencias estadísticamente significativas se etiquetaron como $*P<0.05$, $**P<0.01$ y $***P<0.0001$, para las comparaciones realizadas entre grupos mediante un ANOVA de una vía con el test post-hoc de comparación múltiple de Tukey.

En todas las líneas celulares, se obtuvieron diferencias altamente significativas (****) entre las células incubadas con el tratamiento combinado *versus* todos los demás grupos. En la línea celular HaCaT, la comparación entre el grupo incubado con ZnPc *vs* el grupo control, mostró escasas diferencias significativas (*) a las 24 h de finalizar el tratamiento, que dejaron de ser significativas al realizar el análisis del MTT a las 48 h (ver Fig. 1B).

En células MCF-7, el grupo del TMPyP *vs* el grupo control resultó en diferencias escasamente significativas (*) y el grupo ZnPc *vs* control significativo (**), pero estas diferencias ya no se detectaron

en los resultados del ensayo del MTT a las 48 h de finalizar los tratamientos, como se muestra en la Figura 1B.

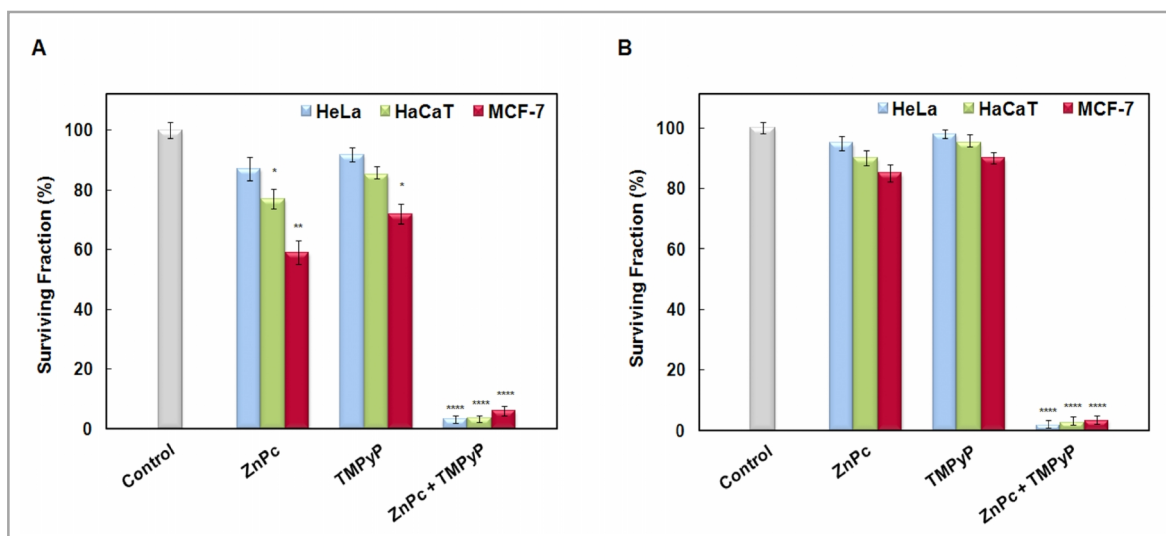


Figura 1. Supervivencia de las células HeLa, HaCaT y MCF-7, evaluada por el ensayo del MTT a las 24 h (A) y 48 h (B) después de 1 h de incubación y 2.4 J/cm² de irradiación.

Del mismo modo, se comprobó que la irradiación roja por si sola (sin preincubación con FS), no inducía efectos fototóxicos, ya que los datos de supervivencia en las tres líneas celulares expuestas a diferentes dosis de luz roja (2.4 J/cm²) fueron similares a los de las células control (no incubadas y no irradiadas) (ver Tabla 1).

Por otra parte, los experimentos realizados para evaluar la **toxicidad en ausencia de irradiación** (dark toxicity), demostraron que la incubación con ambos FSs sin posterior irradiación, no afectaba a la supervivencia celular en ninguna de las líneas celulares analizadas. Es decir, el tratamiento combinado con los dos FSs, no inducía toxicidad en oscuridad. Asimismo, el valor de supervivencia celular fue mayor del 90% en todos los casos (ver Tabla 1).

Tabla 1. Supervivencia de las células HeLa, HaCaT y MCF-7 sometidas a diferentes tratamientos en ausencia de luz o a diferentes dosis de luz sin preincubación con ningún FS.

Línea celular	ZnPc	TMPyP	ZnPc + TMPyP	2.4 J/cm ²	3.6 J/cm ²
HeLa	94 ± 5	98 ± 3	98 ± 3	99 ± 2	99 ± 3
HaCaT	96 ± 6	98 ± 3	99 ± 4	99 ± 3	99 ± 3
MCF-7	91 ± 8	94 ± 3	93 ± 4	99 ± 2	99 ± 4

De los resultados obtenidos de la toxicidad en la oscuridad y la fotoinactivación celular se consideró que, una incubación de 1 h con ZnPc (5×10^{-8} M) + TMPyP (10^{-6} M), seguida de una irradiación de 2.4 J/cm^2 , eran los parámetros óptimos de concentración y dosis de luz para analizar en profundidad un tratamiento fotodinámico muy eficaz en cultivos celulares.

Además, aplicando el método de Valeriote y Lin (explicado en el apartado de materiales y métodos) sobre la viabilidad celular, se pudo comprobar que, el tratamiento fotodinámico combinando ambos FSs, inducía un efecto claramente **sinérgico** en todas las líneas celulares analizadas a las 24 y 48 h después del tratamiento (ver Tabla 2).

Tabla 2. Efecto sinérgico del tratamiento fotodinámico combinado según el método de Valeriote y Lin, a las 24 h.

Línea celular	[A + B]	[A] x [B] / 100	Efecto del tratamiento
HeLa	3 ± 1	80 ± 3	Sinérgico
HaCaT	4 ± 1	66 ± 3	Sinérgico
MCF-7	6 ± 2	43 ± 4	Sinérgico

Nota: A es la viabilidad celular para el tratamiento fotodinámico con ZnPc, B con TMPyP, y A + B para el tratamiento combinado con ambos FSs.

Llegado este punto de la investigación, consideramos que los experimentos posteriores se llevaran a cabo sólo en la línea celular HeLa, seleccionada por su importancia como línea tumoral “modelo” en los estudios de análisis de terapias antitumorales en cultivos celulares.

1B.2 Identificación del mecanismo de fotoinactivación del tratamiento combinado

La identificación del mecanismo de muerte desencadenado en las células HeLa por el tratamiento combinado con los dos FSs, se realizó empleando las siguientes pruebas:

➤ Ensayos morfológicos

1B.2.1 Microscopía de contraste de fase, tinción con rojo neutro y Hoechst-33258

Los tratamientos fotodinámicos llevados a cabo en células HeLa, utilizando dosis de luz de 2.4 o 3.6 J/cm^2 , dieron lugar a dos patrones de morfología de muerte celular: apoptosis y necrosis, respectivamente. El análisis de las alteraciones morfológicas, se llevó a cabo mediante la tinción con rojo neutro (RN) para la evaluación de la morfología general, o el fluorocromo Hoechst-33258 (H-33258) para la tinción del ADN (ver Fig. 2). Se utilizaron criterios morfológicos bien establecidos para la identificación de las células apoptóticas y necróticas.

Las células tratadas con un sólo FS o únicamente irradiadas, presentaban una morfología similar a la de las células HeLa control (imágenes no mostradas). Sin embargo, después del tratamiento fotodinámico sinérgico [ZnPc (5×10^{-8} M) + TMPyP (10^{-6} M) + irradiación], las células mostraron notables cambios morfológicos, en función del intervalo de tiempo transcurrido después de finalizar el tratamiento (3, 6, y 24 h) y de la dosis de luz utilizada (2.4 ó 3.6). Es importante señalar, que las células

así tratadas no perdieron en ningún intervalo de tiempo, la adhesión al sustrato donde recibieron el tratamiento (visualización al microscopio óptico invertido).

Como se muestra en la Figura 2b, **3 h** después del tratamiento fotodinámico (2.4 J/cm^2), un significativo número de células HeLa presentaban, una notable retracción celular, condensación y fragmentación de la cromatina, que son características morfológicas típicas de una muerte apoptótica. A las **6 h** (ver Fig. 2c) y **24 h** (imágenes no mostradas), prácticamente todas las células mostraban una morfología apoptótica.

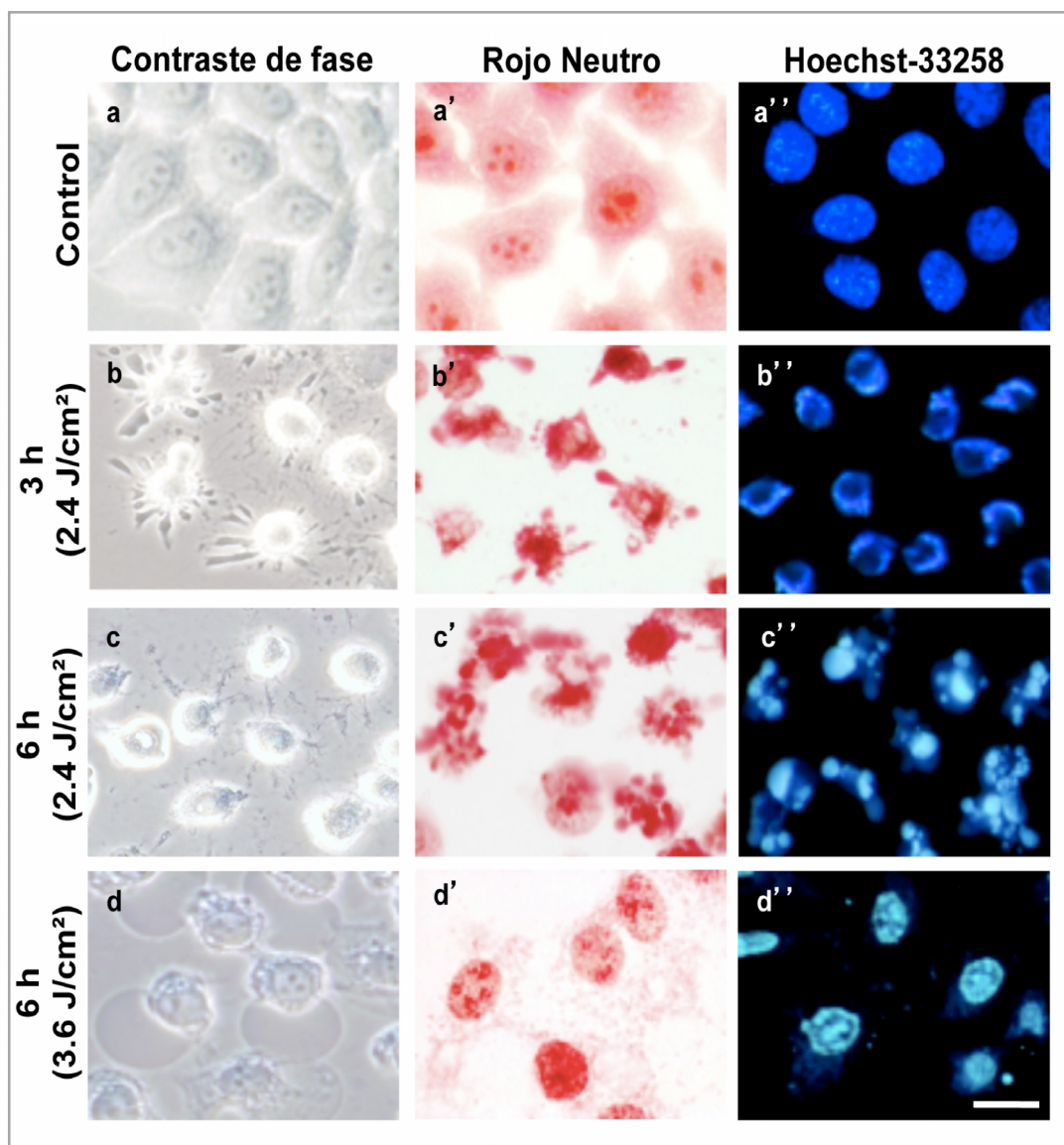


Figura 2. Morfología de células HeLa en contraste de fase, teñidas con RN o con H-33258. **a-a''**: Células control. **b-b''**: Células a las 3 h del tratamiento combinado (2.4 J/cm^2 de irradiación). **c-c''**: Células a las 6 h del tratamiento sinérgico. **d-d''**: Células necróticas a las 6 h del tratamiento combinado y 3.6 J/cm^2 de irradiación. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$.

Del mismo modo, se observó la evolución típica de las alteraciones morfológicas que caracterizan a la muerte por necrosis, cuando la dosis de luz se incrementó a 3.6 J/cm^2 . Los cambios comenzaron

inmediatamente después de la irradiación, y **6 h** después del tratamiento la membrana plasmática formaba una gran “burbuja” claramente observable al microscopio óptico de contraste de fase (ver Fig. 2d). Además, se detectó una condensación uniforme de la cromatina. Transcurridas 24 h después de finalizar el tratamiento, las burbujas habían perdido su integridad y sólo se detectaban restos celulares en el sustrato de cultivo (imágenes no mostradas).

Posteriormente, se llevó a cabo un **recuento** en las muestras teñidas con H-33258, para cuantificar el porcentaje de células con morfología: **viable** (similar a los controles), **apoptótica** y **necrótica**, que se observaban en las células incubadas 1 h con ambos FSs e irradiadas 2.4 ó 3.6 J/cm². Como se muestra en la Figura 3, el mecanismo de muerte celular masivamente desencadenado, dependía claramente de la dosis de luz recibida. Mientras que con 2.4 J/cm² de irradiación, más de un 90% de las células parecían inactivarse por apoptosis, cuando la dosis de luz era de 3.6 J/cm², se generaba una muerte mayoritaria por necrosis (90%), aunque una pequeña proporción mostraba una morfología apoptótica (9%). Estos resultados indicaban que el tratamiento combinado inducía la inactivación de las células HeLa con una elevada eficiencia. Conviene recordar que en ausencia de irradiación, estas concentraciones de FSs no causaron ningún tipo de alteración morfológica.

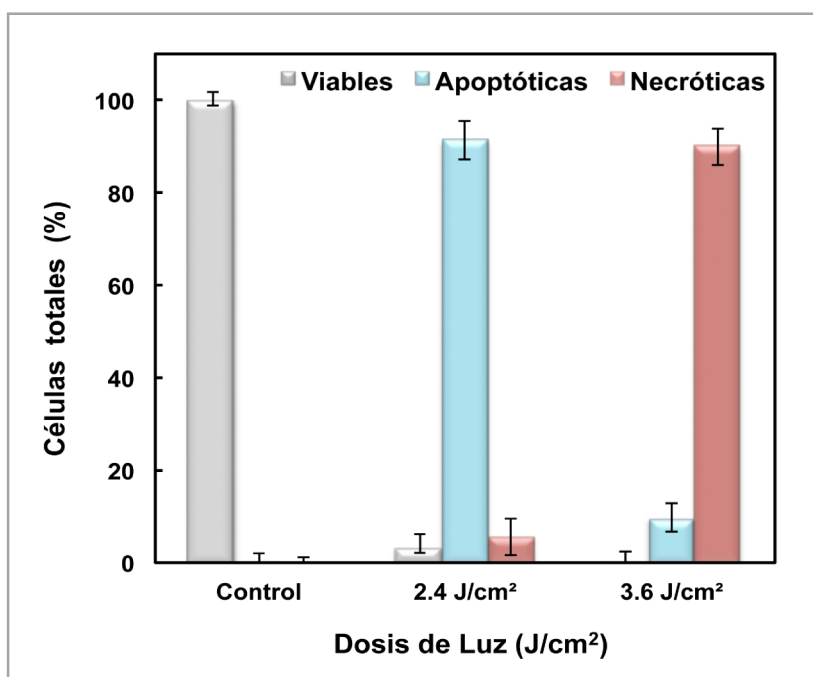


Figura 3. Recuento celular en muestras incubadas 1 h con ambos FSs e irradiadas 2.4 o 3.6 J/cm².

1B.2.2 Microscopía electrónica de barrido (SEM) y de transmisión (TEM)

Las microfotografías tomadas en **SEM** (del inglés: *scanning electron microscopy*), confirmaron los resultados de los análisis morfológicos realizados en microscopía óptica, tal y como se recoge en la Figura 4. En comparación con las células HeLa control, las células incubadas 1 h con los dos FSs e irradiadas con 2.4 J/cm², mostraban notables alteraciones en la superficie celular a las 3, 6 y 24 h

después del tratamiento. Las células control en interfase presentaban una morfología aplanada y poligonal (ver Fig. 4a). Por el contrario, **3 h** después del tratamiento sinérgico (ver Fig. 4b), prácticamente todas las células estaban retraídas, pero aún mostraban prolongaciones citoplasmáticas unidas al sustrato. A las **6 h**, las células mostraron la típica morfología de la apoptosis con deformaciones de la membrana plasmática a modo de "burbujas" y la pérdida de las conexiones intercelulares (ver Fig. 4c). A las **24 h**, sólo se observaron numerosos cuerpos apoptóticos adheridos al sustrato (imágenes no mostradas).

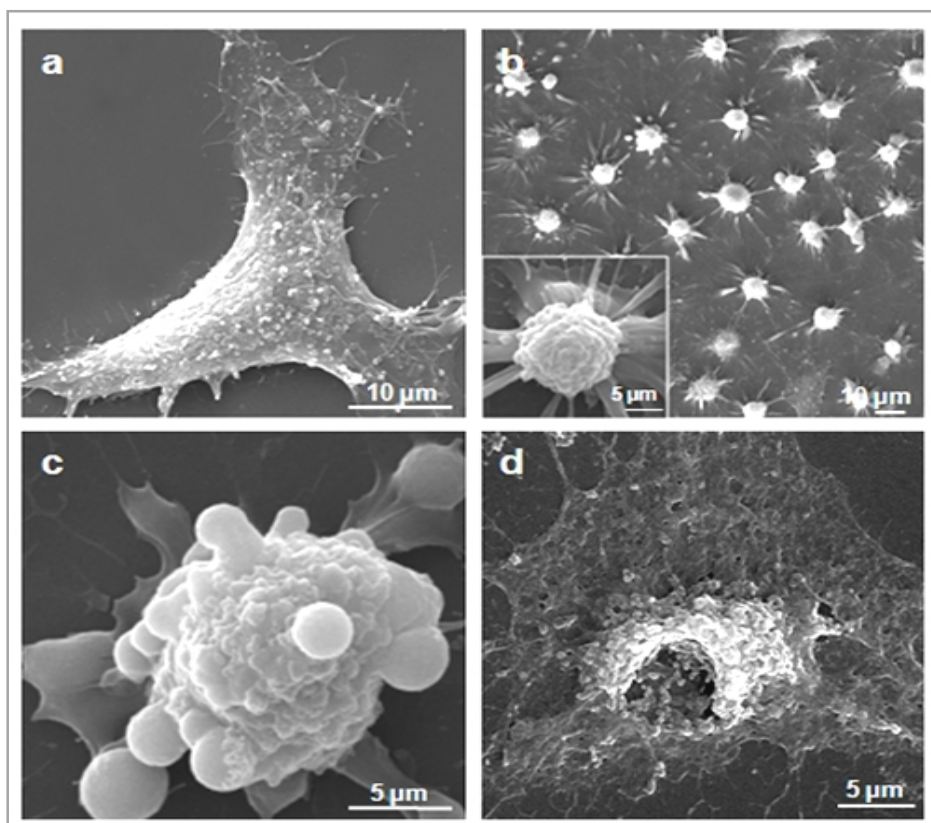


Figura 4. Imágenes representativas de los cambios morfológicos inducidos en las células HeLa incubadas 1 h con ambos FSs + irradiación roja, visualizados al SEM. **a)** Célula control en interfase. **b)** Células 3 h después de la TFD con una dosis de luz de 2.4 J/cm^2 . **c)** Célula en apoptosis 6 h después del tratamiento (2.4 J/cm^2). **d)** Célula necrótica 6 h después del tratamiento con una dosis de irradiación de 3.6 J/cm^2 .

Sin embargo, después del tratamiento con la dosis de luz de 3.6 J/cm^2 , se detectó una generalizada pérdida de la integridad tanto de la membrana plasmática como nuclear, características de la muerte necrótica (ver Fig. 4d). Las células comenzaron el proceso necrótico con una producción inmediata y masiva de pequeñas evaginaciones de la superficie celular (a modo de burbujas), causadas por la pérdida de control del flujo de agua a través de la membrana plasmática, pero aún sin la disrupción de la misma. Unos minutos más tarde, estas deformaciones superficiales convergieron en una gran y única burbuja. Particularmente, las células observadas al SEM **6 h** después de este tratamiento mostraron la pérdida de la integridad de la membrana plasmática después de la separación de la burbuja gigante, con la consiguiente liberación del contenido citoplasmático, al medio externo (ver Fig. 4d).

Por otra parte, las imágenes de células control tomadas mediante **TEM** (del inglés: *transmission electron microscopy*) mostraban un núcleo con cromatina no condensada y con prominentes nucléolos (ver Fig. 5a). En el citoplasma se observaron mitocondrias, perfiles de RE y cisternas del aparato de Golgi.

A las **3 y 6 h** después del tratamiento combinado con dosis de luz de 2.4 J/cm^2 , las células aparecían retraídas y con alteraciones características de sufrir un proceso apoptótico: cromatina nuclear altamente compactada contra la envoltura nuclear y fragmentada. Además, la integridad de la

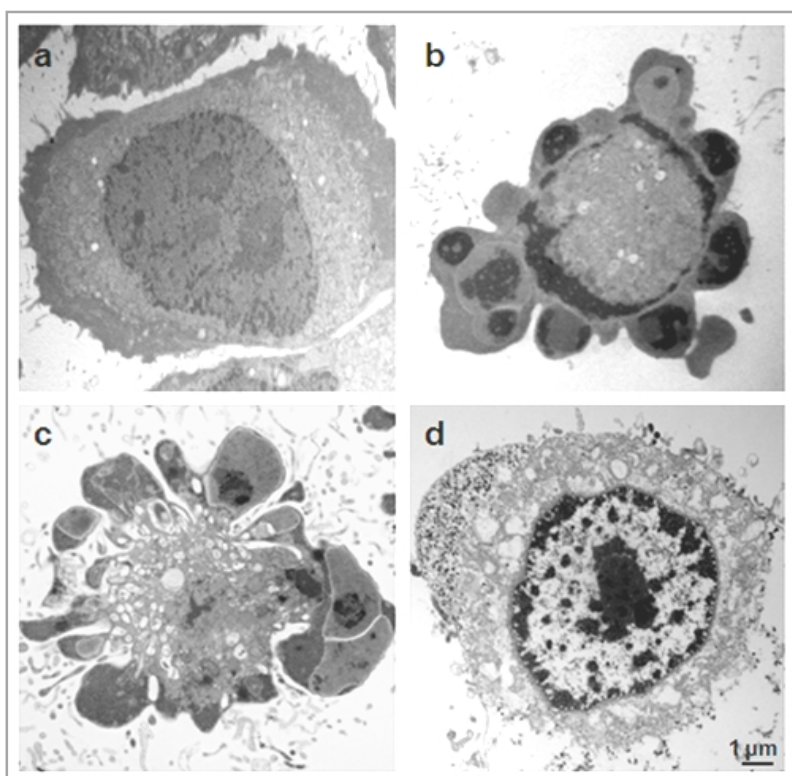


Figura 5. Microfotografías tomadas al TEM. **a)** Células control. **b)** Célula apoptótica a las 3 h del tratamiento combinado (2.4 J/cm^2). **c)** Típica célula en apoptosis después de la TFD (2.4 J/cm^2). **d)** Célula necrótica 6 h después de la TFD (3.6 J/cm^2).

membrana plasmática y la estructura de los orgánulos se conservaban **6 h** después del tratamiento, y aparecían las deformaciones de la membrana, que caracterizan la formación de los cuerpos apoptóticos, por los que se dismantela la célula, sin liberar ningún contenido celular al medio externo. La formación de dichos cuerpos apoptóticos, representa generalmente la etapa final de la apoptosis (ver Fig. 5b y 6c). Por el contrario, **6 h** después del tratamiento con 3.6 J/cm^2 , las células mostraron un gran número de vesículas sin orgánulos claramente distinguibles y masas de cromatina fuertemente compactadas, características de una muerte necrótica.

➤ Ensayos bioquímicos

El desencadenamiento de la apoptosis después del tratamiento sinérgico, se confirmó mediante diversos ensayos bioquímicos, que se muestran en los 4 paneles de la Figura 6.

Los cambios en el **potencial de membrana mitocondrial** ($\Delta\Psi_m$) fueron analizados por citometría de flujo mediante el DiOC₆(3) (ver panel A).

Después de **1 h** del tratamiento, casi un 50% de las células mostraban una disminución en la intensidad de la señal de DiOC₆(3), porcentaje que se incrementaba hasta un 80%, **18 h** después del tratamiento. Esta despolarización de la membrana mitocondrial (pérdida del $\Delta\Psi_m$), se considera un evento temprano de la apoptosis.

Los resultados del ensayo de la **anexina-V** obtenidos en células Hela se muestran en la Figura 6B. Células tratadas con el protocolo combinado (dosis de luz 2.4 J/cm^2) mostraron un primer marcaje positivo de la membrana plasmática para anexina-V entre 1-2 h después del tratamiento. Una tinción nuclear parcial con yoduro de propidio (IP) fue detectable a intervalos de tiempo posteriores (2-3 h). El valor máximo de fluorescencia para Anexina-V se detectó a las 3 h (24% de células apoptóticas tempranas (anexina-V⁺, IP⁻) y 40% de células apoptóticas tardías (anexina-V⁺, IP⁺). A las 3 h el porcentaje de viabilidad celular fue sólo del 36%. Por otro lado, a las 3 h, cuando la dosis de luz se incrementó a 3.6 J/cm^2 , el porcentaje de células necróticas fue del 94% y la viabilidad celular fue sólo del 4%.

Asimismo, los resultados obtenidos con el **ensayo TUNEL** nos permitieron detectar *in situ* las células apoptóticas y corroborar la inducción de esta ruta de muerte (ver Panel C de la Fig. 6). En las células control y las sólo irradiadas, observamos un marcaje TUNEL negativo, incluso forzando al máximo la sensibilidad del microscopio para capturar las imágenes. De este modo, se confirmó que la simple irradiación con luz roja no inducía la vía apoptótica (datos no mostrados).

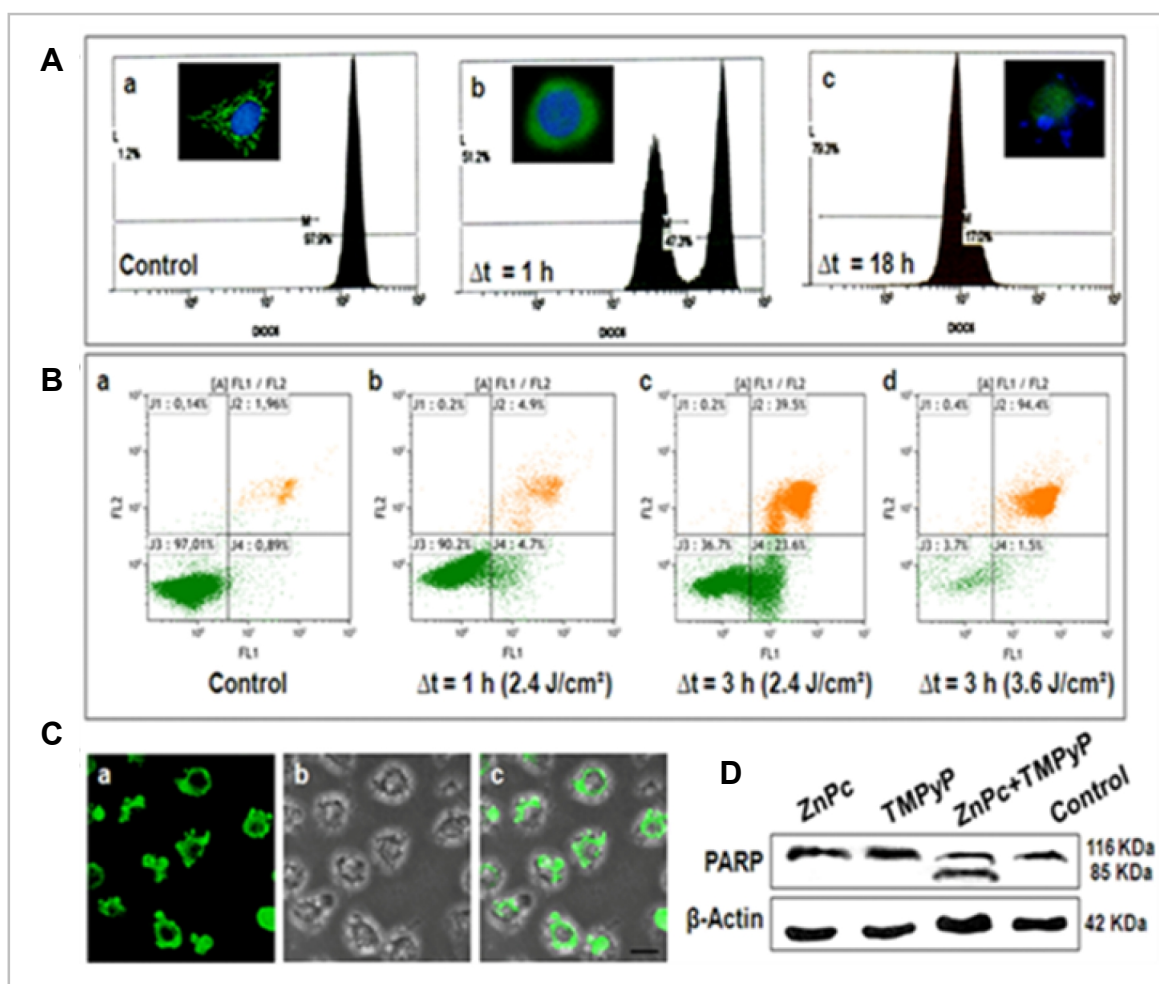


Figura 6. A: Análisis del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) por citometría de flujo mediante el marcaje con DiOC6(3), con imágenes de las células en microscopía de fluorescencia. **a)** Células control. **b-c)** Células 1 y 18 h después del tratamiento, respectivamente. **B:** Histogramas de citometría de flujo para la detección de anexina-V-FITC en combinación con IP. **a)** Células control. **b-c)** Células 1 y 3 h después del protocolo combinado (2.4 J/cm^2), respectivamente. **d)** Células tratadas con 3.6 J/cm^2 a las 3 h. **C:** Células 6 h después del tratamiento, evaluadas mediante el ensayo TUNEL. **a)** Células TUNEL-positivas. **b)** Imagen en contraste de fase. **c)** Imagen fusionada. Barra de escala: 10 μm . **D:** Fragmentación de PARP revelada mediante Western Blot.

Tampoco se observó señal fluorescente en las células tratadas con ambos FSs y analizadas **3 h** después del tratamiento fotodinámico (datos no mostrados), lo que indica que la fragmentación internucleosomal del ADN todavía no se había producido. Por el contrario, se obtuvo un marcaje TUNEL positivo en prácticamente todas las células procesadas **6 h** después del tratamiento, lo que indicaba que las células HeLa sufren la fragmentación del ADN típica de la apoptosis, en el intervalo de tiempo transcurrido entre las 3 y 6 h después del tratamiento. Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante la tinción con H-33258, donde se constató que la típica condensación y fragmentación apoptótica se producía a las 6 h, y no antes.

La muerte celular por apoptosis, en las células tratadas con ambos FSs, fue también confirmada por la **fragmentación de PARP** revelada por wester blot. PARP es una enzima de reparación del ADN, que es lisada en dos fragmentos, uno de 116 KDa y otro de 85 KDa, por la caspasa-3 activa. La Figura 6 (panel D) demuestra que la escisión de PARP fue detectada solamente después del tratamiento sinérgico, concretamente a las **6 h**.

Asimismo, y mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta se pudo observar en microscopía confocal, que el tratamiento sinérgico inducía la relocalización de la proteína proapoptótica **Bax** desde el citosol hacia la mitocondria. Como se muestra en el panel A de la Figura 7, las células control (sin tratar) mostraban sólo una difusa fluorescencia citoplasmática verde (al igual que las células sólo irradiadas). De forma similar, **1 h** después del tratamiento combinado sinérgico, casi el 80% de las células tratadas presentaban la misma localización subcelular de Bax que las células control. Por el contrario, **3 y 6 h** después del tratamiento fotodinámico, las células mostraron una intensa fluorescencia verde en las mitocondrias (ver Fig. 7Ab-d).

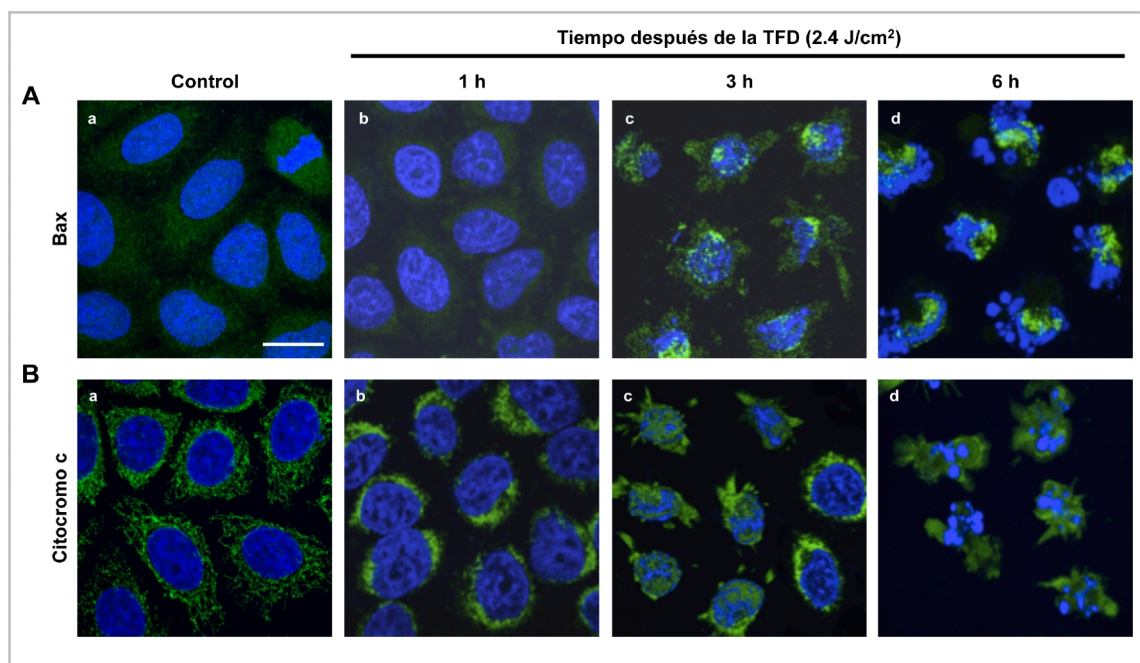


Figura 7. A: Imágenes de microscopía confocal para inmunofluorescencia de Bax (verde) y contratinción con H-33258 (azul). **a)** Células control con la señal de Bax difusa en el citosol. **b-d)** Células 1, 3 y 6 h después del tratamiento fotodinámico, respectivamente, mostrando una señal mitocondrial de Bax en las células con cromatina condensada y fragmentada 3 y 6 h después del tratamiento. **B:** Efecto de la TFD combinada en la distribución del citocromo c detectada por inmunofluorescencia indirecta (verde) y contratinción con H-33258 (azul). **a)** Células no tratadas. **b-d)** Células 1, 3 y 6 h después del tratamiento. Barra de escala: 10 μ m.

La contratinción con H-33258 permitió una caracterización morfológica simultánea de la apoptosis. Curiosamente, algunas células mostraron relocalización de Bax pero cromatina no fragmentada, 3 h después de la TFD (ver Fig. 7Ac), lo que indicaba que la relocalización de Bax a la mitocondria precede a la fragmentación nuclear.

Por otra parte, las técnicas de inmunofluorescencia para el **citocromo c** -mostradas en la Figura 7B- evidenciaron que **1 h** después del tratamiento, una significativa proporción de células presentaba las mitocondrias con una forma redondeada y una disposición perinuclear, aunque el citocromo c todavía no había sido liberado al citosol, como indicaba el patrón de fluorescencia punteada observado (ver Fig. 7Bb). Sin embargo, **6 h** después de la irradiación, la mayoría de las células mostraron una fluorescencia citosólica difusa y una cromatina fragmentada.

Finalmente, analizamos la cinética de activación de una de las caspasas efectoras más relevantes en la apoptosis, la **caspasa-3**, tanto por técnicas de inmunofluorescencia indirecta, como por citometría de flujo (para cuantificar la señal de emisión de fluorescencia de la caspasa-3 activa).

La inmunofluorescencia de caspasa-3 en microscopía confocal, mostró un rápido incremento en la señal después del tratamiento sinérgico (ver Fig. 8). La mayoría de las células presentaban un marcaje positivo, a los **30 min** de finalizar dicho tratamiento (datos no mostrados), que se mantenía **1 y 3 h** después, y era claramente distinguible de la débil y difusa señal roja característica de las células HeLa control.

Debido a que la apoptosis es un proceso gradual, que no se desencadena en todas las células de forma simultánea, se pudo detectar una señal de fluorescencia para caspasa-3 activa, incluso **6 h** después del tratamiento (ver Fig. 8d), aunque el porcentaje de células positivas y la intensidad de la señal, fueron inferiores en relación a las muestras de 3 h.

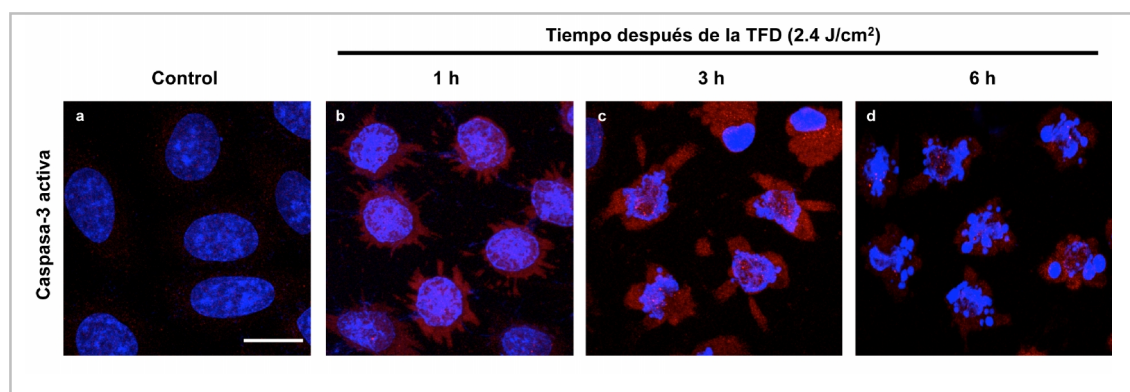


Figura 8. Inmunofluorescencia indirecta de caspasa-3 activa (rojo) y contratinción con H-33258 (azul). **a)** Células HeLa control. **b-d)** Células 1, 3 y 6 h después del tratamiento sinérgico, respectivamente. Barra de escala: 10 μm .

La Figura 9 muestra los datos obtenidos del análisis de las muestras tratadas con el protocolo combinado, mediante citometría de flujo. Como se puede observar, estos datos concuerdan totalmente con los resultados previos observados mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta para caspasa-3 activa.

En este sentido, se detectó un rápido y notable incremento en la intensidad de la señal en las muestras analizadas, en comparación con las células control, que sólo presentaban una emisión basal de fluorescencia para caspasa-3 activa.

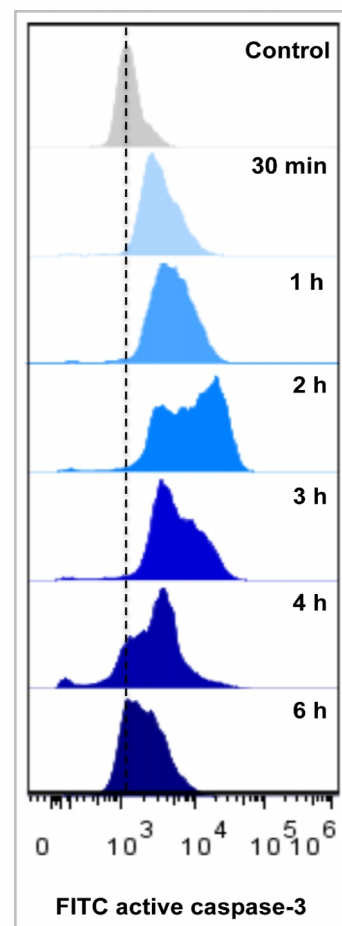
A los **30 min** del tratamiento sinérgico, casi un 70% de las células mostraban un incremento en la intensidad de la señal de fluorescencia, que se mantuvo hasta **1 h** después del tratamiento (80% de las células positivas), y la intensidad de la señal se incrementó en un orden de magnitud con respecto a las muestras analizadas a los 30 min. Asimismo, **2 y 3 h** después del tratamiento, un 90% de las células fueron positivas para caspasa-3 activa, y en comparación con los tiempos anteriores, la intensidad de la señal fue aún mayor.

A las **4 h** del tratamiento sinérgico, todavía un 70% de las células presentan caspasa-3 activa, aunque los valores medios de activación disminuían hasta los niveles observados en las muestras analizadas 1 h después de la irradiación.

A las **6 h** después de la irradiación, un 40% de las células presentaban un marcaje positivo para dicho enzima, aunque el valor medio de fluorescencia fue inferior al de las muestras analizadas a los 30 min del tratamiento.

En resumen, mediante este análisis pudimos comprobar que la máxima activación de la caspasa-3 se produce entre las 2-3 h después del tratamiento sinérgico.

Figura 9. Diagramas de citometría de flujo mostrando la intensidad de la señal de fluorescencia de caspasa-3 activa, en muestras de células HeLa control y tratadas, 30 min, 1, 2, 3, 4 y 6 h después del tratamiento sinérgico.



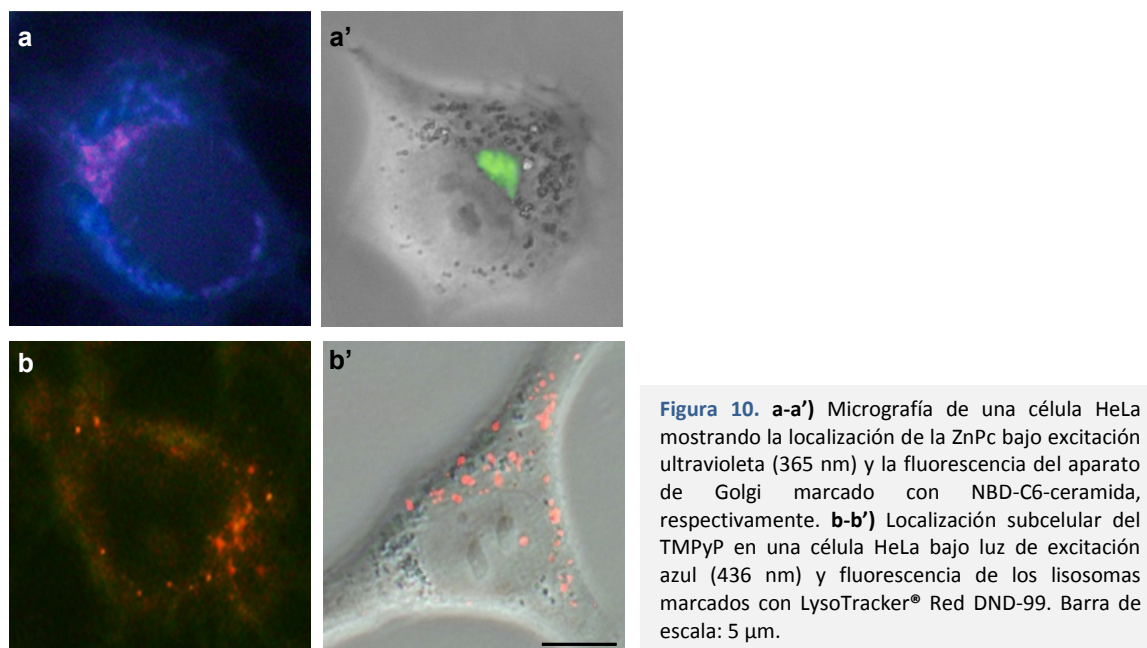
1B.3 Localización subcelular, relocalización y acumulación de los FSs

La Figura 10 muestra la **localización subcelular**, analizada en microscopía de fluorescencia, después de 1 h de incubación con ZnPc 5×10^{-8} M o TMPyP 10^{-6} M sin posterior irradiación. La **ftalocianina** mostró un patrón de localización citoplasmática (fluorescencia roja), limitada a una zona perinuclear, claramente discernible de la autofluorescencia azul de las mitocondrias y que parece corresponderse con el aparato de Golgi marcado con NBD- C_6 -ceramida (ver Fig. 10a').

Por el contrario, las células HeLa incubadas con la **porfirina** catiónica mostraron una fluorescencia roja en forma de gránulos dispersos por el citoplasma, de tamaño, morfología y distribución similar a los lisosomas marcados con el LysoTracker® Red DND-99 (ver Fig. 10b').

Es importante señalar que, las imágenes de los FSs se obtuvieron utilizando la máxima sensibilidad de captura del microscopio, debido a la débil intensidad de la fluorescencia y al rápido apagamiento de la misma de ambos FSs, promovido por la baja concentración utilizada en el protocolo combinado, no

pudiéndose llevar a cabo los posibles experimentos de colocalización con marcadores específicos de estos orgánulos.



En el presente trabajo de investigación, también se analizó la posible **relocalización** de ambos FSs después del tratamiento sinérgico. Únicamente a las **6 h** de finalizar éste, se detectó una clara relocalización tanto de la ZnPc como del TMPyP en la mayoría de las células (apoptóticas), con las correspondientes señales de fluorescencia de los FSs en el núcleo celular. Sin embargo, tal como se muestra en la Figura 11 (señalada con una flecha), el escaso número de células que mantenía una morfología viable, no presentaba ningún tipo de fluorescencia nuclear, lo que indicaba que sólo después de la muerte celular, se producía la relocalización de los FSs.

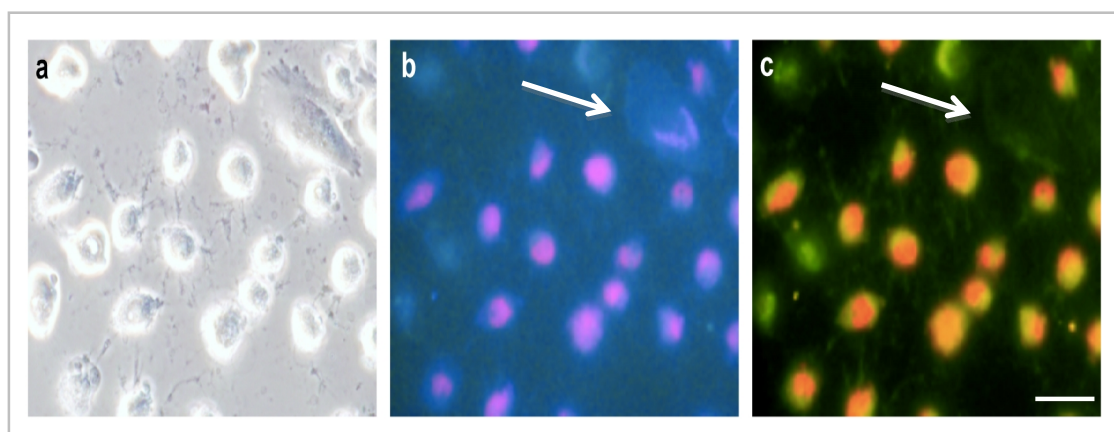


Figura 11. Relocalización de los FSs en células HeLa a las 6 h del tratamiento sinérgico. a) Imagen en contraste de fase. b) El mismo campo de células mostrando la relocalización de la ftalocianina (excitación UV). c) Relocalización de la porfirina (excitación azul) en el mismo campo. Barra de escala: 5 μ m.

Por otra parte, mediante técnicas espectrofluorimétricas se determinó la **acumulación** de cada uno de los FSs en el interior de las células HeLa. Los resultados obtenidos indicaron que la **ZnPc** se internalizaba en mayor cantidad ($118.1 \pm 4.7 \text{ ng}/10^6 \text{ células}$) que el **TMPyP** ($40.8 \pm 9.5 \text{ ng}/10^6 \text{ células}$), después de 1 h de incubación.

1B.4 Alteraciones de los orgánulos diana

Teniendo en cuenta los patrones de localización subcelular detectados para la ZnPc y el TMPyP (aparato de Golgi y lisosomas, respectivamente), también se analizaron las posibles alteraciones sufridas en estos orgánulos, después del tratamiento sinérgico.

La organización del aparato de Golgi se evaluó mediante inmunofluorescencia indirecta para la golgina-130. Los resultados se pueden observar en la Figura 12. Las células incubadas con ambos FSs durante 1 h, irradiadas $2.4 \text{ J}/\text{cm}^2$ y procesadas **30 min** y **1 h** después de finalizar el tratamiento, presentaban la señal de la golgina localizada en posición perinuclear, de forma análoga a las células control, conservando aún intacta la estructura del aparato de Golgi (ver Fig. 12a). Sin embargo, **3 h** pero especialmente **6 h** después del tratamiento, las células presentaron una desorganización muy pronunciada de dicho orgánulo, observándose un marcaje mayoritariamente difuso (ver Fig. 12b-c).

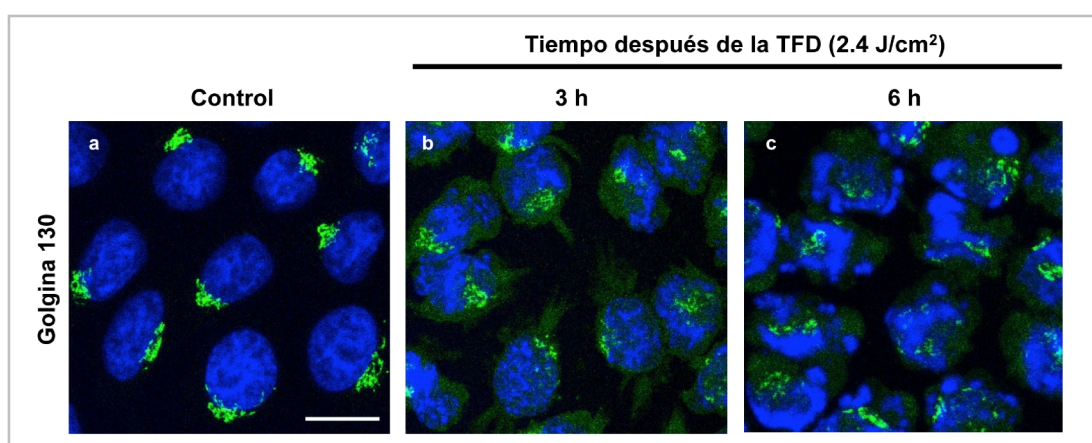


Figura 12. Imágenes de microscopía confocal para inmunofluorescencia indirecta de golgina-130 (verde) y contratinción con H-33258 (azul). **a)** Células HeLa control. **b-c)** Células 3 y 6 h después del tratamiento sinérgico, respectivamente. Barra de escala: 10 μm .

En relación con el estudio realizado sobre la alteración de la organización del aparato de Golgi después del tratamiento sinérgico, también quisimos analizar la posible activación de la **caspasa-2**, teniendo en cuenta que se ha descrito que se localiza tanto en el núcleo como en dicho orgánulo, y que tiene una importante implicación en la muerte celular inducida, entre otros factores, por ROS.

Las muestras con células HeLa se procesaron para una inmunofluorescencia indirecta de caspasa-2 activa a distintos tiempos después de la irradiación. Las imágenes de la Figura 13 muestran solo un muy ligero fondo rojo en las muestras control. Por el contrario, **1 h** después del tratamiento sinérgico, se había producido la activación de esta enzima, observándose una intensa señal roja en posición perinuclear, que persistía a las **3 h** después del tratamiento, comenzando a observarse a este tiempo las

alteraciones nucleares propias del proceso apoptótico. A las **6 h** del tratamiento, la señal de fluorescencia de la caspasa-2, era principalmente difusa por todo el citoplasma.

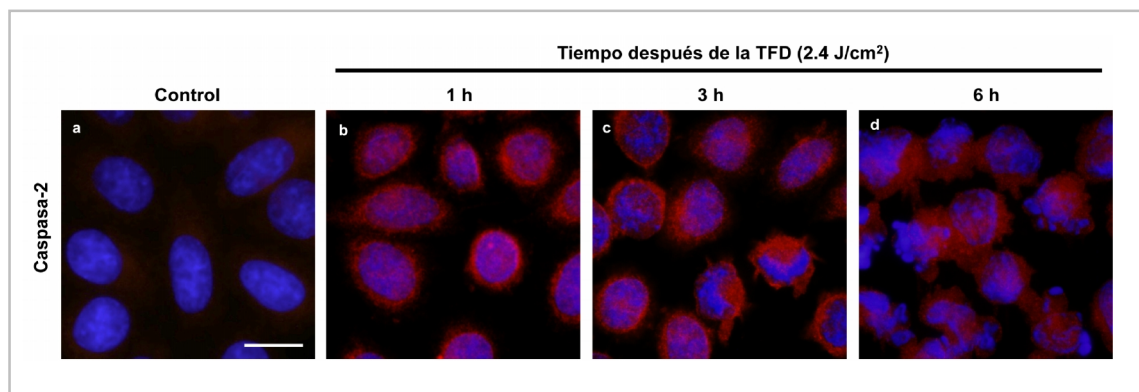


Figura 13. Inmunofluorescencia indirecta de caspasa-2 activa (rojo) y contratinción con H-33258 (azul). **a)** Células HeLa control. **b-d)** Células 1, 3 y 6 h después del tratamiento sinérgico, respectivamente. Barra de escala: 10 μm .

Por otra parte, también utilizamos la tinción con el colorante **naranja de acridina (AO)** para detectar si los lisosomas habían sufrido una permeabilización de su membrana después del tratamiento sinérgico, ya que el TMPyP, en nuestras condiciones experimentales, presentaba una localización lisosomal en células HeLa.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 14. Las células HeLa control, mostraron la intensa fluorescencia anaranjada del AO en los lisosomas y una fluorescencia verde en el citoplasma y el núcleo, donde los nucléolos aparecían más marcados, de forma similar a las muestras sólo incubadas con un FS e irradiadas (imágenes no mostradas).

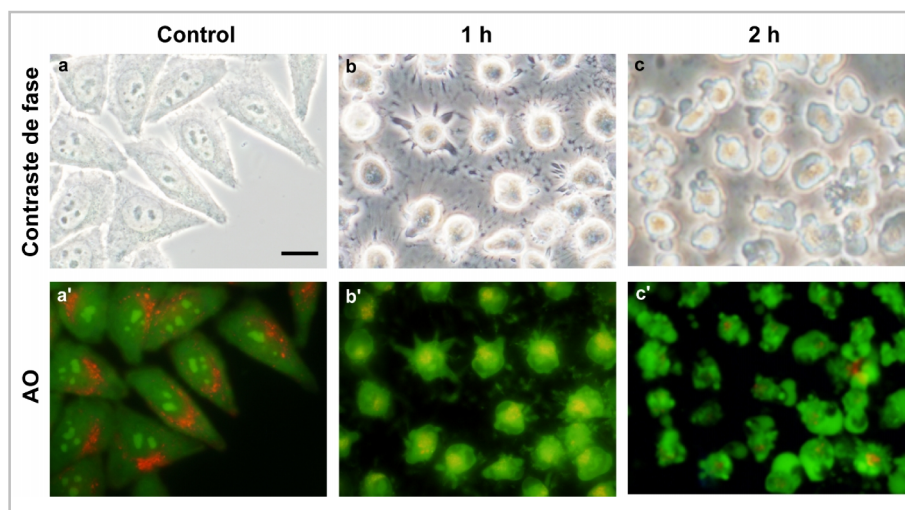


Figura 14. Visualización de células HeLa en contraste de fase y tinción con naranja de acridina (AO). **a-a')** Células control. **b-c')** Células 1 y 2 h después del tratamiento sinérgico, respectivamente. Barra de escala: 10 μm .

Sin embargo, las células tratadas con el protocolo combinado revelaron cambios generalizados en el patrón de fluorescencia. La clara localización lisosomal del AO se perdía progresivamente, lo que indicaría que se había producido una permeabilización de la membrana de los lisosomas, después del tratamiento sinérgico. De hecho, 2 h después del tratamiento la señal del AO en los lisosomas fue mínima.

1B.5 Detección *in situ* de la generación de ROS

La inducción de la generación de **ROS** después del tratamiento sinérgico, se evaluó mediante la sonda DCFH-DA. Como se muestra en la Figura 15, el tratamiento inducía la producción de cantidades muy significativas de ROS (fluorescencia verde) y el nivel de ROS aumentó gradualmente con el tiempo después de la irradiación, alcanzando un valor máximo en el intervalo entre los 30 min y 1 h. Como control positivo para este ensayo células HeLa fueron expuestas a H_2O_2 . Las muestras sólo incubadas con ZnPc o sólo con TMPyP e irradiadas, presentaron patrones de fluorescencia similares a la muestra control (datos no mostrados).

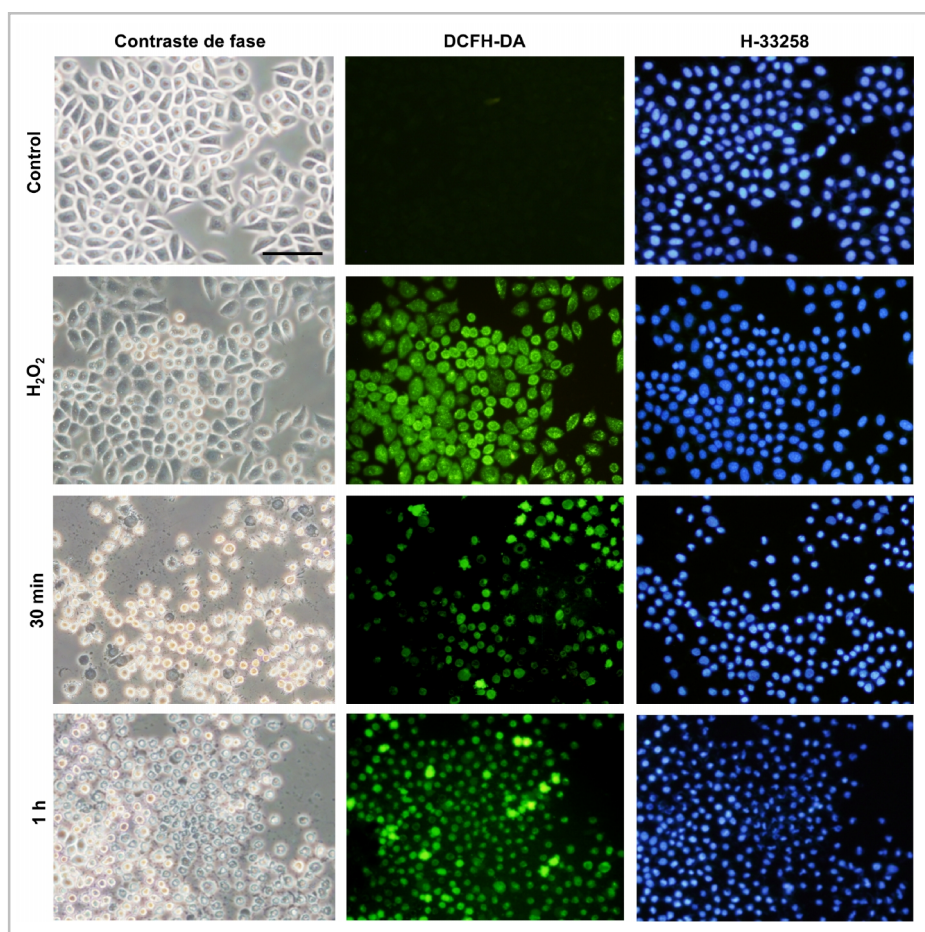


Figura 15. Caracterización cualitativa de la generación de ROS por el ensayo DCFH-DA. Las células se visualizaron bajo contraste de fase o microscopía de fluorescencia para DCF (verde) y H-33258 (azul). **a-a'')** Células control. **b-b'')** Células preincubadas con H_2O_2 (control positivo). **c-d'')** Células 30 min y 1 h después del tratamiento sinérgico, respectivamente. Barra de escala: 50 μm .

1B.6 Alteraciones del citoesqueleto y de proteínas de adhesión

El panel A de la Figura 16 muestra los resultados del análisis de la morfología de los microtúbulos (abreviados como, MTs) mediante inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina-FITC, seguida de una contratinción con H-33258, analizados en microscopía de fluorescencia confocal.

Las células HeLa control en interfase mostraban una disposición radial de los MTs, distribuidos por toda la célula. Sin embargo, las células sometidas al tratamiento fotodinámico sinérgico, presentaban una progresiva desorganización de la red de los MTs interfásicos, ya observable a las **3 h** (ver panel A, Fig. 16b), pero especialmente marcada, a las **6 h** de finalizar dicho tratamiento, donde el marcaje de los MTs quedaba reducido a pequeñas estructuras esféricas asociadas a los núcleos con la cromatina condensada y fragmentada (ver panel A, Fig. 16c).

Es importante destacar la ausencia completa de figuras mitóticas en estas muestras. Sin embargo, las células tratadas con un único FS, sólo irradiadas, o incubadas con ambos FSs pero sin irradiar, mostraron una distribución similar a la de las células control (imágenes no mostradas).

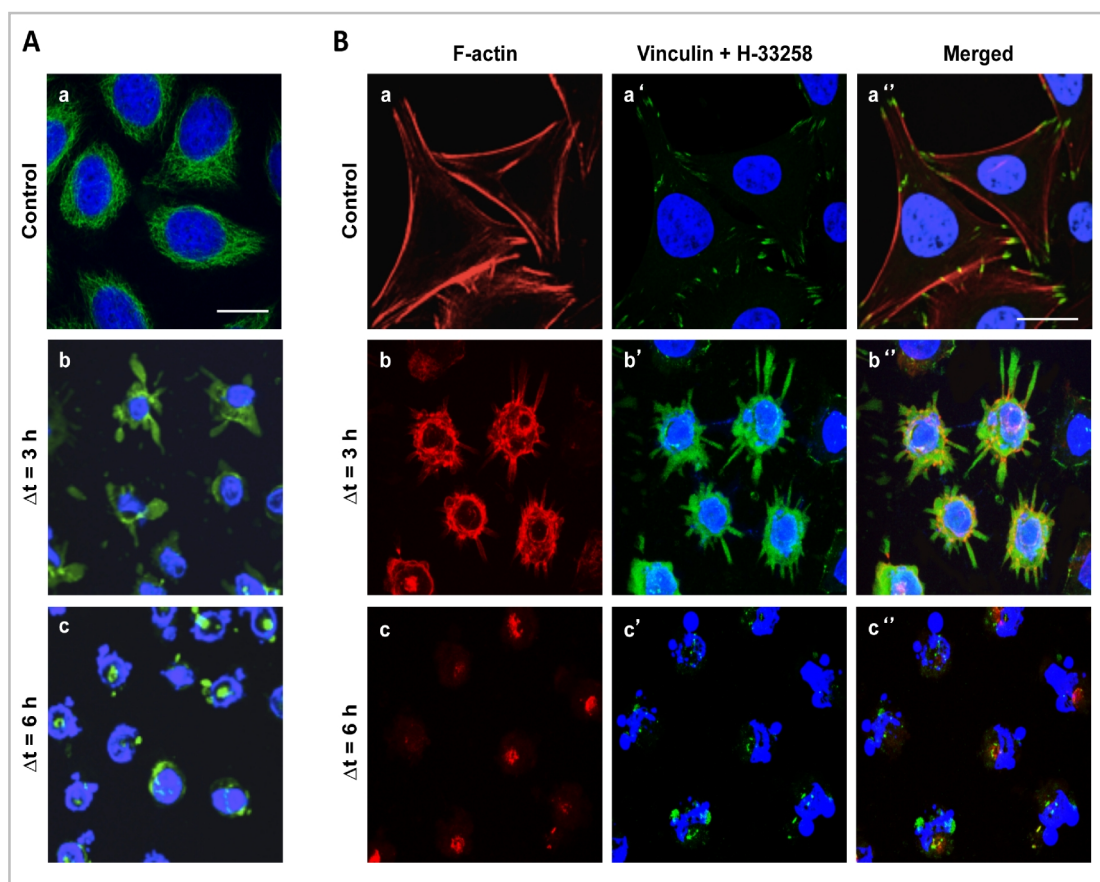


Figura 16. A: Inmunofluorescencia para tubulina (verde) y contratinción con H-33258 (azul). **a)** Control HeLa. **b-c)** Células 3 y 6 h después del tratamiento apoptótico, respectivamente. **B:** Visualización del marcaje de F-actina (rojo), vinculina (verde) y contratinción con H-33258 (azul). **a-a'')** Células control. **b-c'')** Células 3 y 6 h después del tratamiento, respectivamente. Las imágenes de ambos paneles se obtuvieron en microscopía confocal. Barra de escala: 10 μm .

Para obtener una mayor información sobre los mecanismos de inactivación celular, se investigaron las alteraciones inducidas por la TFD combinada en los **microfilamentos de actina** (abreviados como MFs) y en la proteína **vinculina**, que están implicados en la adhesión celular. Dichos efectos se analizaron mediante la tinción con faloidina conjugada a rodamina e inmunofluorescencia indirecta para vinculina, respectivamente, seguida de una contratinción con H-33258.

El panel B de la Figura 16 muestra la secuencia de eventos relacionados con los MFs y la vinculina, asociados al tratamiento sinérgico. Como se puede apreciar, las células HeLa control mostraron fibras de estrés recorriendo el citoplasma, así como fibras subcorticales, que finalizaban en los contactos focales. Precisamente, en esta diferenciación de la membrana plasmática, se localiza la proteína vinculina, implicada en la adhesión celular.

A las **3 h** del tratamiento sinérgico, las células presentaban una clara alteración en la distribución tanto de los MFs de actina, claramente asociada al cambio en la morfología celular detectada previamente mediante microscopía óptica, como de la proteína vinculina que aparecía localizada en los grandes filopodios generados. Además, los núcleos de las células presentaban una cromatina fuertemente condensada (ver panel B, Fig. 16b-b''). Transcurridas **6 h**, los MFs aparecían completamente despolimerizados y únicamente se detectó un marcaje puntual cerca del núcleo. De forma simultánea, se manifestó una gran pérdida de la expresión de vinculina y los núcleos presentaron una morfología típicamente apoptótica.

Debido a la observación de la disminución en la expresión de la proteína vinculina, decidimos investigar los efectos del tratamiento combinado sobre la expresión y distribución de la **quinasa de adhesión focal** (FAK; del inglés *Focal Adhesion Kinase*), una proteína clave en la adhesión y señalización celular. Los resultados se muestran en la Figura 17.

En las células control, FAK se encuentra en los puntos de adhesión focal. Como se acaba de comentar, **1 h** después del tratamiento, las células se redondean y muestran una clara retracción, pero mantienen las largas extensiones, a modo de filopodios, que contienen actina-F.

Sin embargo, FAK está mucho menos expresada en relación con las células control, aunque todavía hay pequeños puntos de color verde brillante, responsables del mantenimiento de la adhesión celular. A las **3 h**, pero principalmente **6 h** después del tratamiento combinado, la señal de FAK aparecía difusa en el citoplasma, y se detectó una clara reducción en su expresión en las células con la cromatina apoptótica. A las **24 h** ambas proteínas mostraron una expresión casi nula. Es interesante resaltar, que el tratamiento con los FSs individuales o sólo con luz roja, no inducía ningún cambio en la distribución y la morfología, tanto de los MFs como de la proteína FAK (imágenes no mostradas).

Por otra parte, mediante el uso de la **vídeomicroscopía**, se evaluó de forma independiente la eficacia de fotosensibilización de las células después del tratamiento combinado, como se puede observar en las imágenes de la Figura 18A, pero especialmente en el vídeo S2 (inducción de una apoptosis masiva) y en el vídeo S1 (control), aportados como material suplementario al ejemplar presentado.

De este modo pudimos corroborar que el tratamiento sinérgico (2.4 J/cm^2), inducía una entrada progresiva de las células en apoptosis y que las células completaban el proceso completo de apoptosis, sin perder su adhesión al sustrato (desde las etapas más tempranas a las más avanzadas).

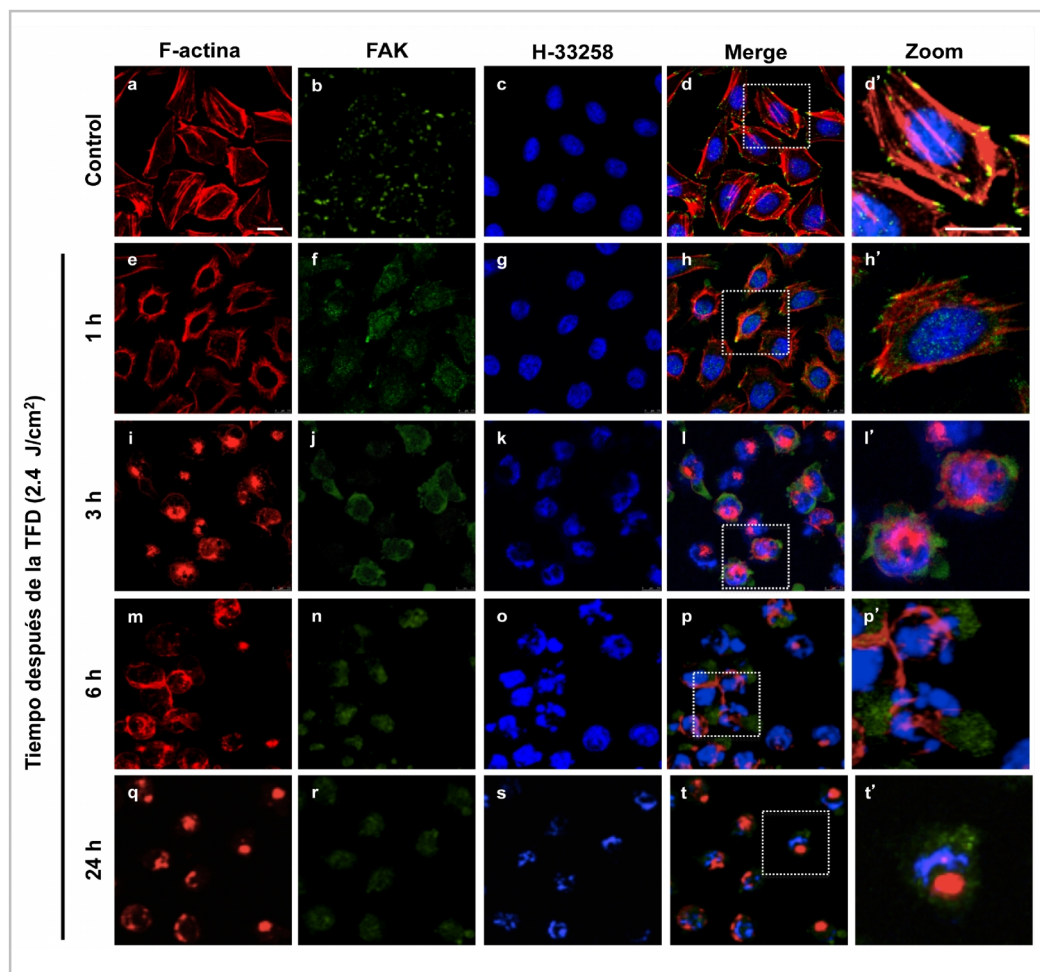


Figura 17. Visualización de F-actina marcada con faloidina-TRITC (rojo), inmunofluorescencia de FAK (verde) y contratinción con H-33258 (azul); imágenes superpuestas y mayor magnificación. **a-d')** Células HeLa control. **e-t')** Células 1, 3, 6 y 24 h después del tratamiento combinado, respectivamente. Barra de escala: 10 μm .

De forma similar, también mediante técnicas de videomicroscopía, pudimos demostrar que las células incubadas con ambos FSs, pero irradiadas con 3.6 J/cm^2 , se fotoinactivaban por un mecanismo necrótico (ver vídeo S3 en el material suplementario aportado).

Posteriormente, también se analizó, la **migración celular** mediante el ensayo de “curación de herida” (en inglés, *scratch assay*) durante un periodo total de 48 h, con el fin de determinar si se inducía migración celular después del tratamiento de TFD sinérgico (ver panel B de la Fig. 18).

Nuestros resultados mostraron que la fracción mínima de células HeLa que no inducían la muerte celular (3%) no presentaba ninguna capacidad de cierre de heridas después del daño inducido por la TFD.

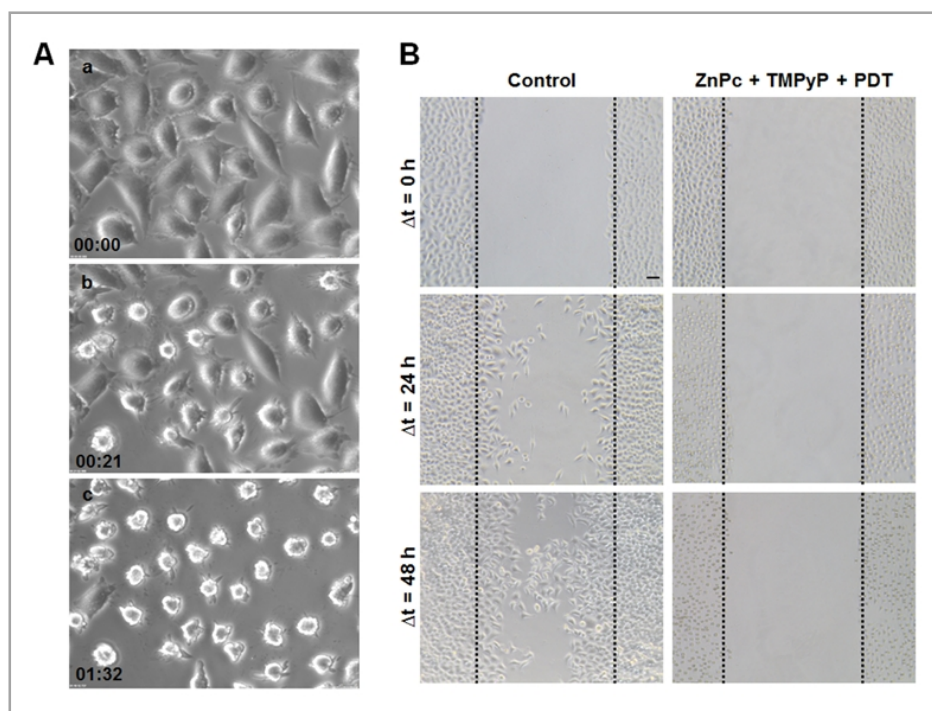


Figura 18. A: Imágenes seleccionadas de videomicroscopía, del mismo campo del cultivo de células HeLa, mostrando la iniciación y la progresión de la apoptosis después del tratamiento sinérgico (0, 30 y 90 min). **B:** Análisis de la capacidad de migración celular por el ensayo de curación de herida. Barra de escala: 50 μ m.

Finalmente, se llevó a cabo un recuento mediante hemocitómetro del porcentaje de células adheridas al sustrato, tanto inmediatamente después, como a las 24 h de finalizar los diferentes tratamientos, con el fin de revelar posibles efectos a largo plazo del tratamiento combinado de TFD sobre la adhesión celular (ver Fig. 19).

Inmediatamente después de la irradiación, el porcentaje de células adheridas fue de un 100% en todas las muestras (control, ambos FSs sin irradiación y el tratamiento de TFD combinado) (datos no mostrados).

A las **24 h**, el porcentaje de células adheridas fue mayor en caso del control y en las muestras no irradiadas con respecto a esas mismas condiciones a las 0 h, debido a que las células continuaron proliferando. Ni la irradiación roja, ni la incubación con ambos FSs (sin irradiación) afectaban el ciclo de las células HeLa.

En el caso del tratamiento combinado más irradiación, sólo una pequeña fracción de las células se despegaron del sustrato de cultivo, 24 h después de la irradiación (menos del 10%).

En resumen, las células tratadas no mostraron ninguna pérdida de adhesión al sustrato donde crecían, y por lo tanto, los tratamientos combinados no afectaban la adhesión celular al sustrato de cultivo.

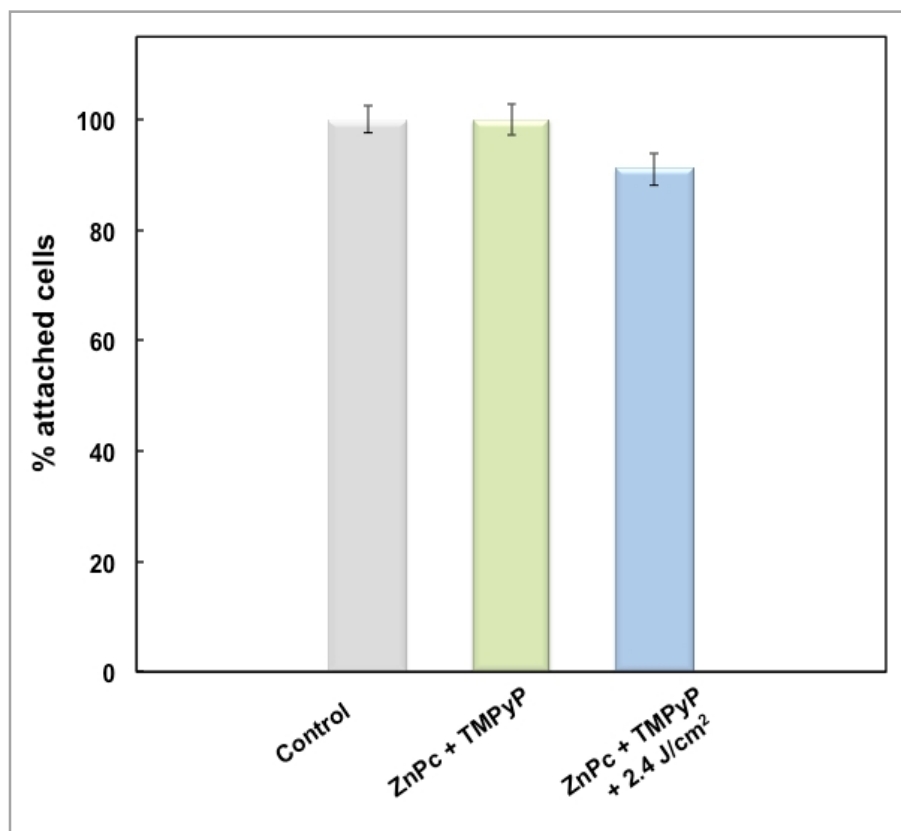


Figura 19. Porcentaje de células adheridas al sustrato 24 h después del tratamiento combinado (sin y con irradiación). Los valores representan la media \pm desviación estándar, de al menos 5 experimentos independientes.

1. Ensayos realizados *in vitro* en cultivos celulares 2D

1C. Efecto de la vehiculización del TMPyP en NPs mesoporosas de sílice

Los estudios relacionados con la síntesis y la administración de nuevos FSs, resultan fundamentales para el desarrollo de la TFD. En el presente trabajo de investigación, se ha analizado la eficacia fotodinámica de la porfirina catiónica TMPyP vehiculizada en nanopartículas de sílice, en la línea celular establecida HeLa. Las células fueron incubadas con el FS libre o bien incorporado en NPs mesoporosas de sílice (**MSNPs**), a diferentes concentraciones, seguido de distintos tiempos de irradiación con luz de longitud de onda en el rango de 400-440 nm. Dichas MSNPs fueron sintetizadas y caracterizadas fisicoquímicamente en el laboratorio del Dr. Nonell del Institut Químic de Sarrià (Universitat Ramon Llull, Barcelona). A continuación se comentan los resultados más relevantes.

El óxido de silicio (también denominado sílice) es uno de los materiales inorgánicos más utilizados en aplicaciones biomédicas, debido a: **i)** su elevada biocompatibilidad, **ii)** su estabilidad fisicoquímica y térmica, y **iii)** por ser un material transparente para la luz de radiaciones superiores a 200 nm, por lo que como vehiculizadores para agentes de TFD, no interfieren con la absorción de la luz por parte de los FSs.

El método de encapsulación utilizado fue la adsorción del FS tanto en la superficie de las MSNPs así como en los poros de las mismas, a través de interacciones electrostáticas, ya que el TMPyP es un FS tetracatiónico y la superficie de las MSNPs tiene un potencial z negativo en medio acuoso (-22 ± 4 mV). Estas MSNPs poseían un diámetro de 245 ± 45 nm, en medio acuoso. En la Figura 1 se muestran micrografías obtenidas por SEM de las MSNPs vacías en etanol, con un tamaño del diámetro de poro de 77 ± 1 Å.

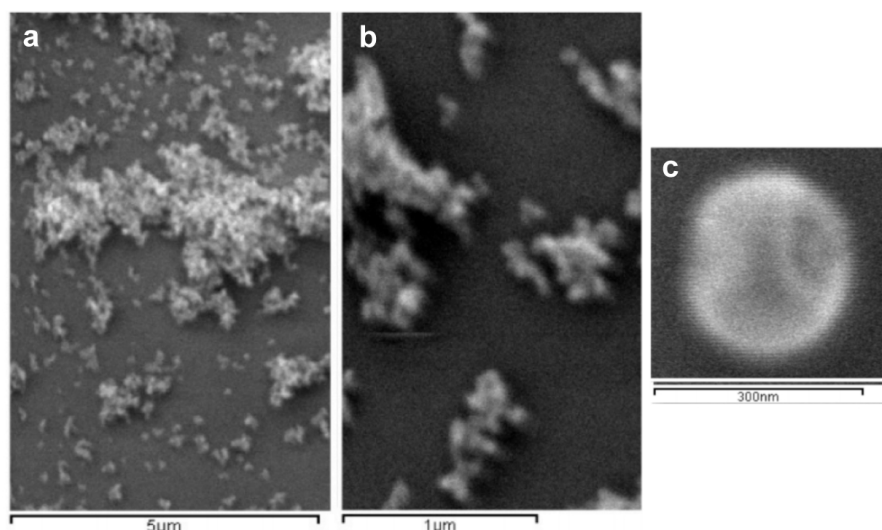


Figura 1. Imágenes de SEM **a)** MSNPs dispersas. **b)** Mayor aumento del campo anterior **c)** Detalle de una MSNP aislada de unos 300 nm de diámetro. Nótese la geometría esférica que caracteriza a estas partículas.

Para caracterizar las MSNPs encapsuladas con TMPyP, se registraron los **espectros de absorción y de emisión de fluorescencia** (excitando a 520 nm) en etanol y en PBS, para compararlos con los del TMPyP libre en una solución de etanol (Fig. 2). En cuanto a la absorción, no hubo cambios en la

distribución de las bandas entre el TMPyP encapsulado en las NPs y el TMPyP libre. No obstante, hubo un pequeño desplazamiento en el espectro en PBS, y más scattering (dispersión de la luz al atravesar un material), porque las NPs son menos estables en PBS que en etanol. En todos los casos, se observó una banda con un pico máximo de absorción en la región azul del espectro (alrededor de los 420 nm), que corresponde con la zona de Soret, y que es mucho más intensa que las bandas de absorción alrededor de los 500 nm. En el caso de la emisión de fluorescencia, se detectó que, tanto en el TMPyP adsorbido como en el TMPyP en solución etanólica, había dos bandas bien definidas, lo que indicaba que la porfirina no se encontraba en un estado agregado. En el caso de la solución de MSNPs en PBS, la banda estaba menos estructurada porque el TMPyP es menos soluble en PBS que en etanol y puede formar agregados.

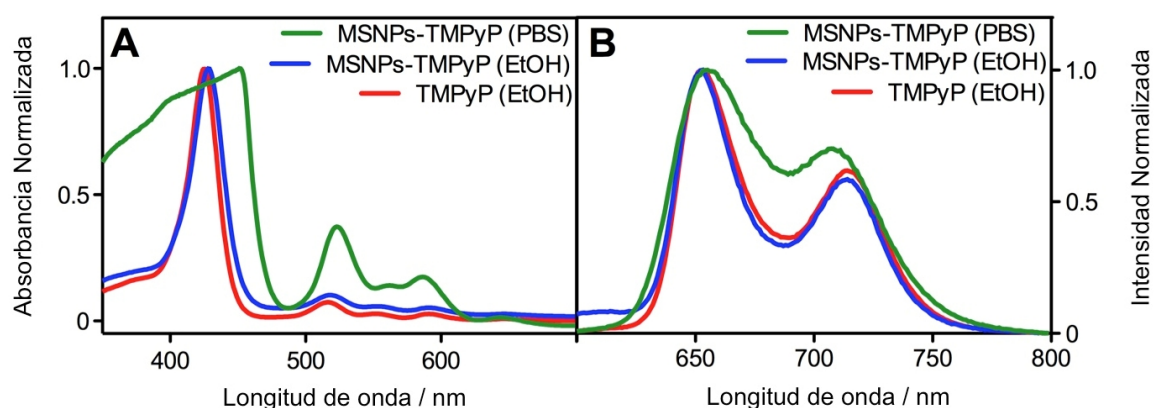


Figura 2. A) Espectros de absorción. B) Espectros de emisión de fluorescencia. (Excitación a 520 nm).

Asimismo, se analizó la **producción de $^1\text{O}_2$** de las MSNPs cargadas con el FS, tanto en medio acuoso como en etanol, y en ambos casos se observó generación de $^1\text{O}_2$ (ver Fig. 3).

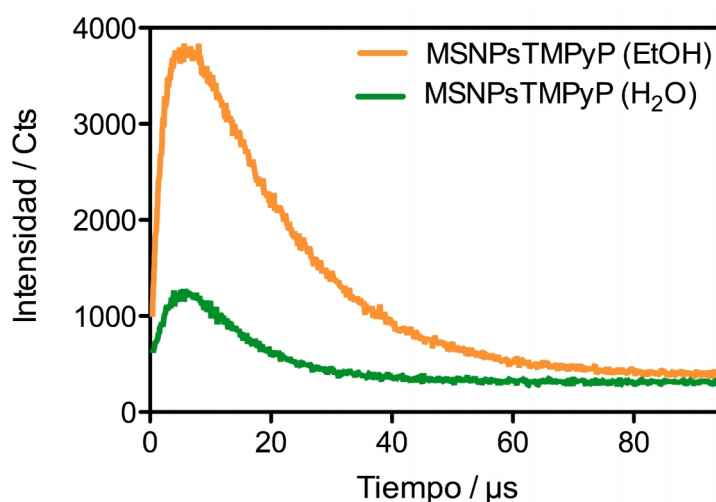


Figura 3. Transitorios obtenidos observando las muestras a 1275 nm y excitando a 532 nm.

Finalmente, se estudió la posible **liberación** del TMPyP de las MSNPs, ya que es un aspecto importante debido a que el FS estaba unido a las NPs por adsorción y no covalentemente. Para ello, se midió la cantidad de FS liberado cada 15 días durante un periodo total de 45 días, tanto en medio acuoso como en etanol. Los resultados obtenidos, indicaron que la liberación fue mayor en el caso de la muestra en EtOH que en el medio acuoso (PBS), algo sorprendente teniendo en cuenta que el TMPyP es una molécula muy soluble en agua. Para las muestras en PBS la liberación de TMPyP no superó en ningún caso el 1%.

1C.1 Localización subcelular y cuantificación del FS acumulado

La **localización** del FS TMPyP (Figura 4) en células HeLa, tanto libre como incorporado en MSNPs, se llevó a cabo aprovechando las propiedades fluorescentes de dicho FS. El espectro de emisión evidenció que el TMPyP emite una fluorescencia roja, cuando se excita con luz azul (ver Figura 2). En la Figura 4, se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos en microscopía de fluorescencia, con excitación azul y UV; así como, imágenes del mismo campo, superpuestas con la obtenida en microscopía de campo claro, para observar la localización en el interior de las células HeLa. Tanto en las células incubadas 18 h con TMPyP libre 0.1 μM (Fig. 4D), como en las tratadas con MSNPs-TMPyP, en las mismas condiciones de concentración y tiempo de incubación (Fig. 4G), se detectó una localización con un patrón lisosomal del TMPyP, emitiendo una fluorescencia roja que se apagaba rápidamente.

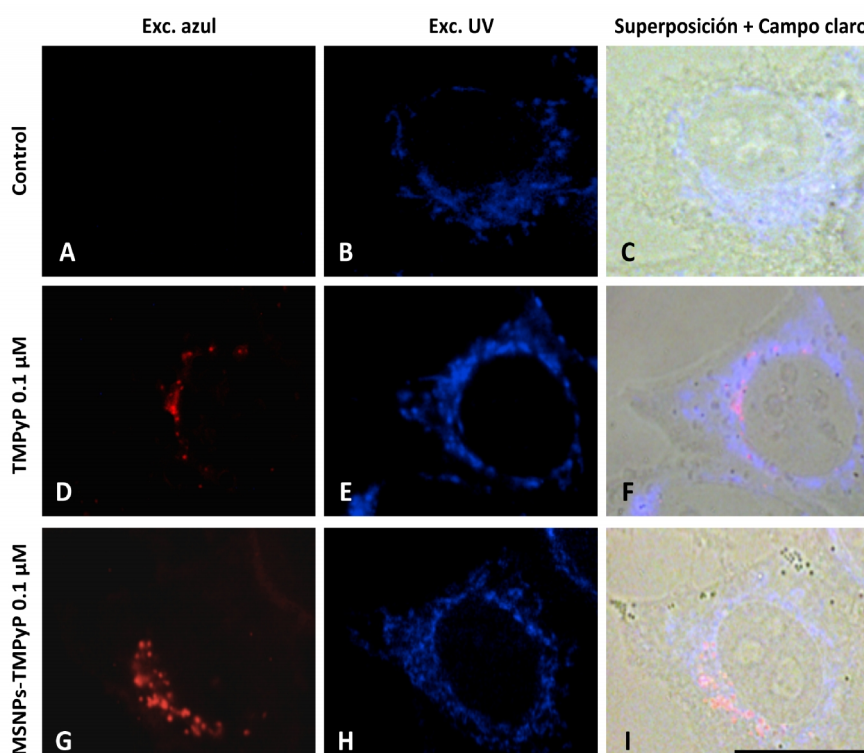


Figura 4. Células HeLa visualizadas en microscopía de fluorescencia (excitación azul y UV) y en campo claro. **A-C)** Células HeLa control (no tratadas). **D-F)** Células incubadas 18 h con TMPyP libre 0.1 μM . **G-I)** Células incubadas 18 h con MSNPs-TMPyP 0.1 μM . Barra de escala = 15 μm .

Es importante señalar, que la cantidad de estructuras fluorescentes redondeadas, parecía mayor cuando las células se incubaban con el FS incorporado en MSNPs, que cuando se administraba el TMPyP de manera libre. Cuando los mismos campos de células se excitaron con luz UV, se detectó la autofluorescencia de las mitocondrias. Además, las imágenes en campo claro, indicaron que la acumulación de TMPyP (libre o en MSNPs), no inducía alteraciones en la morfología celular, ya que ésta era similar a la de las células control (no incubadas con el FS). Asimismo, en las células control, no se detectaba ningún tipo de fluorescencia roja (ver Fig. 4A).

La Figura 5 muestra la intensidad media de la fluorescencia emitida por el TMPyP en células incubadas durante 18 h con diferentes concentraciones de FS (0.1, 0.5, 0.75 y 1 μM), tanto disuelto directamente en el medio de cultivo, como incorporado en MSNPs, analizada mediante citometría de flujo. Cuando el TMPyP se administró en forma libre, las células incrementaron ligeramente la acumulación del FS en función de la concentración, siendo máxima a 1 μM . De forma similar, las células incubadas con MSNPs-TMPyP, mostraron también una acumulación de FS en función de la concentración de TMPyP incorporado en las NPs, cuando las concentraciones fueron de 0.1 a 0.75 μM ; siendo la cantidad de FS incorporado en el interior de las células HeLa, unas 10 veces superior, en relación a la administración de TMPyP en forma libre. Sin embargo, cuando la concentración de MSNPs-TMPyP se aumentó a 1 μM , se detectó una disminución de la cantidad de TMPyP acumulado por las células, posiblemente debido a que las MSNPs-TMPyP tienden a formar agregados a partir de una cierta concentración, disminuyendo la eficacia de entrada y/o el rendimiento de emisión de fluorescencia.

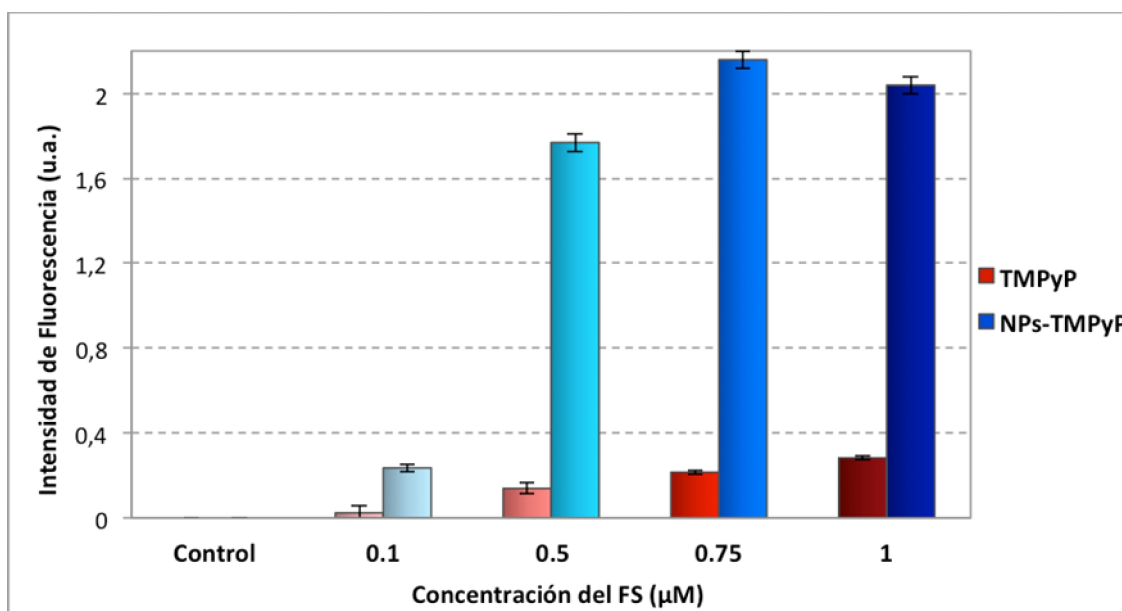


Figura 5. Acumulación de TMPyP administrado en forma libre (diagrama de barras en rojo) o incorporado en NPs de sílice (diagrama de barras en azul), en el interior de las células HeLa después de 18 h de incubación, en función de la concentración del FS.

1C.2 Citotoxicidad: ensayo del azul tripán *in situ*

➤ Toxicidad en la oscuridad (dark toxicity)

El ensayo de citotoxicidad del azul tripán *in situ*, llevado a cabo 24 h después de la incubación de células HeLa durante 18 h con TMPyP ó MSNPs-TMPyP (0.075, 0.1 y 1 μM), evidenció que las células tratadas presentaron porcentajes de viabilidad superiores al 98%, por lo tanto, similares a los de las células control (no tratadas) (ver Fig. 6). Es decir, el FS (administrado en forma libre o en NPs de sílice) no inducía efectos citotóxicos en oscuridad (dark toxicity), en ninguna de las condiciones experimentales utilizadas.

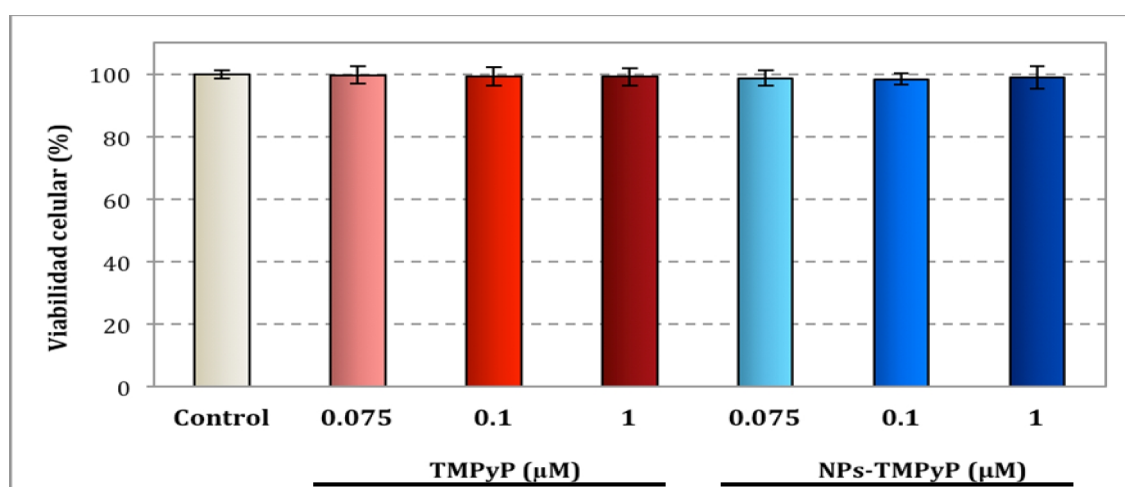


Figura 6. Supervivencia de células HeLa incubadas 18 h con TMPyP y MSNPs-TMPyP (0.075, 0.1 y 1 μM) analizada mediante el ensayo del azul tripán *in situ* a las 24 h del tratamiento.

La Figura 7, muestra imágenes representativas del escaso número de células no viables (azules), que han sido incubadas con el FS (vehiculizado y sin vehiculizar en NPs), a las 24 h de finalizar el tratamiento.

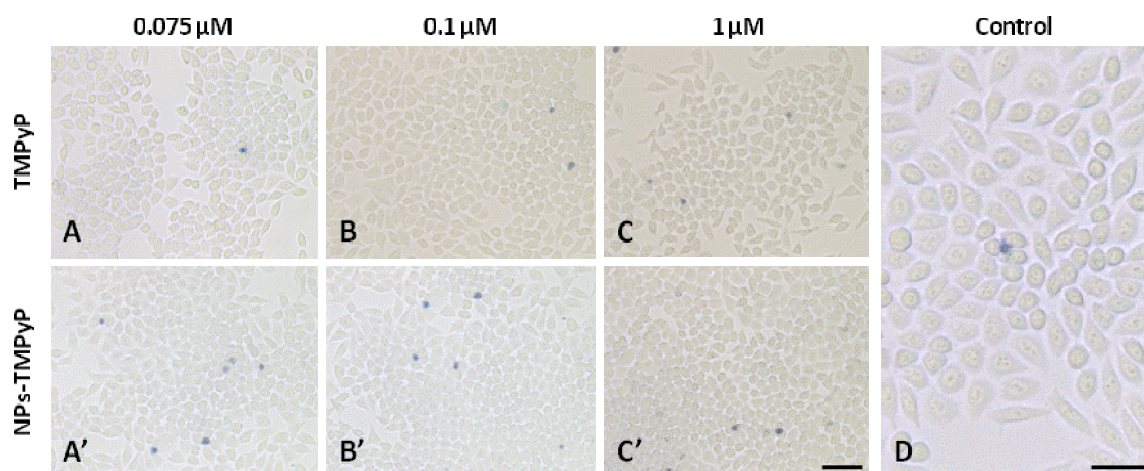


Figura 7. Imágenes del ensayo del azul tripán en células HeLa tratadas 18 h con TMPyP y MSNPs-TMPyP (0.075, 0.1 y 1 μM), a las 24 h del tratamiento. **A-C)** Células incubadas con TMPyP administrado en forma libre a 0.075, 0.1 y 1 μM , respectivamente. **A'-C')** Células tratadas con TMPyP incorporado en MSNPs a 0.075, 0.1 y 1 μM , respectivamente. **D)** Células control (no tratadas). Barra de escala = 20 μm .

➤ Fototoxicidad

La citotoxicidad inducida por los distintos tratamientos fotodinámicos, es decir, cuando las células fueron incubadas 18 h con TMPyP ó MSNPs-TMPyP y posteriormente irradiadas, se evaluó a las 24 h de finalizar éstos, mediante el ensayo del azul tripán *in situ* y mediante el ensayo colorimétrico del MTT (datos no mostrados). Como se observa en la Figura 8, las células incubadas con TMPyP libre e irradiadas, evidenciaron que la viabilidad celular se veía poco afectada cuando la concentración de FS utilizada fue de 0.075 ó 0.1 μM , con tiempos de irradiación de 10 y 15 min (dosis total de luz: 4.8 y 7.2 J/cm^2 , respectivamente), ya que los porcentajes de supervivencia obtenidos fueron superiores al 89%. Sin embargo, cuando la concentración de TMPyP libre, se aumentó a 1 μM la supervivencia celular disminuyó hasta un 31%, cuando el tiempo de irradiación fue de 10 min y a un 6% cuando el tiempo de irradiación fue de 15 min.

Los tratamientos fotodinámicos con TMPyP incorporado en MSNPs, indujeron efectos citotóxicos mucho más drásticos (ver Fig. 8). Las células incubadas con MSNPs-TMPyP (0.075 ó 0.1 μM) e irradiadas (10 ó 15 min), presentaban una drástica reducción de la viabilidad en función de la concentración y del tiempo de irradiación. Los mayores efectos fotocitotóxicos, se alcanzaron con incubaciones de MSNPs-TMPyP 0.1 μM e irradiaciones de 10 min y 15 min (8% y 2% de supervivencia, respectivamente).

Por el contrario, cuando se incrementó la concentración de MSNPs-TMPyP a 1 μM , no se detectaron efectos citotóxicos muy significativos, tanto después de una irradiación de 10 min como de 15 min (porcentajes de supervivencia: 85 y 83%, respectivamente).

Estos últimos resultados evidencian la necesidad de acumulación del FS en el interior de las células (sin elevados estados de agregación), para que el tratamiento fotodinámico aplicado sea capaz de inactivar a las células HeLa.

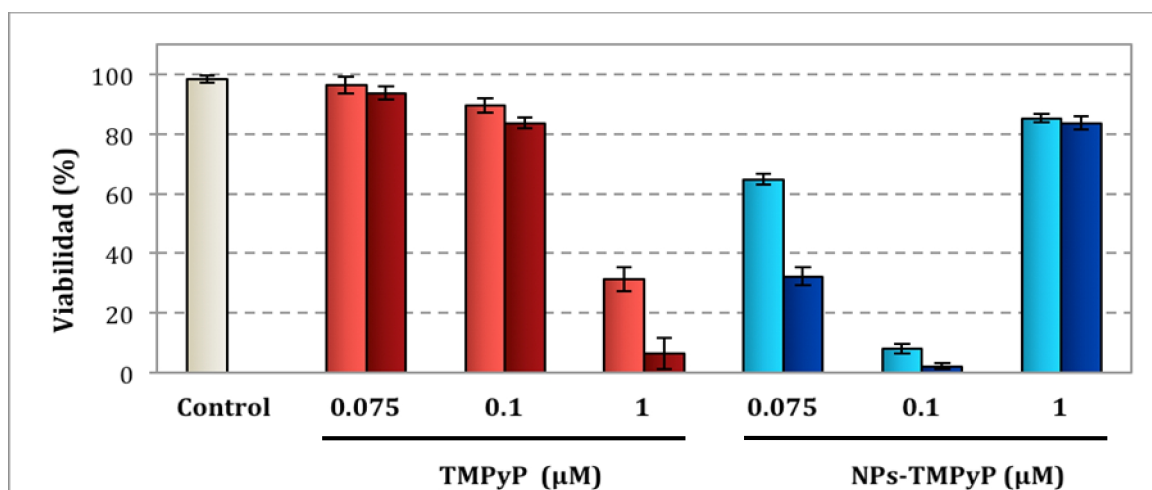


Figura 8. Supervivencia de células HeLa incubadas durante 18 h con TMPyP (diagrama de barras en rojo) y MSNPs-TMPyP (diagrama de barras en azul) a distintas concentraciones (0.075, 0.1 ó 1 μM) e irradiadas 10 ó 15 min, mediante el ensayo del azul tripán *in situ*. Los tonos más claros corresponden a irradiaciones de 10 min y los más oscuros de 15 min.

Por otra parte, las células no incubadas con el FS pero irradiadas (10 ó 15 min; 4.8 y 7.2 J/cm², respectivamente), presentaron unos porcentajes de viabilidad superiores al 97%, por lo tanto, similares a los de las células control (no incubadas y no irradiadas). Es decir, las dosis de luz utilizadas en nuestros ensayos (controles de irradiación), no indujeron ningún tipo de toxicidad *per se* (ver Figura 9). Asimismo, la viabilidad celular no se vio afectada cuando las células se incubaron con las NPs de sílice sin TMPyP y se irradiaron. De este modo se descartó que el efecto fotocitotóxico inducido, fuese debido a las MSNPs y no al TMPyP que llevan incorporado.

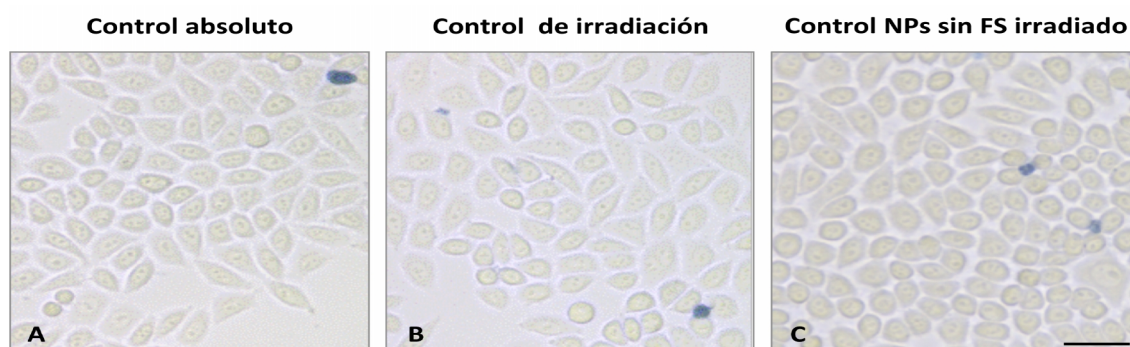


Figura 9. A: Células no incubadas ni irradiadas. B: Células no incubadas e irradiadas 15 min (control de irradiación). C: Células incubadas con MSNPs sin TMPyP e irradiadas. Barra de escala = 20 μm .

La Figura 10 muestra imágenes representativas de los distintos efectos citotóxicos inducidos, cuando después de la incubación, las células se irradiaron durante 10 ó 15 min (panel A y B, respectivamente).

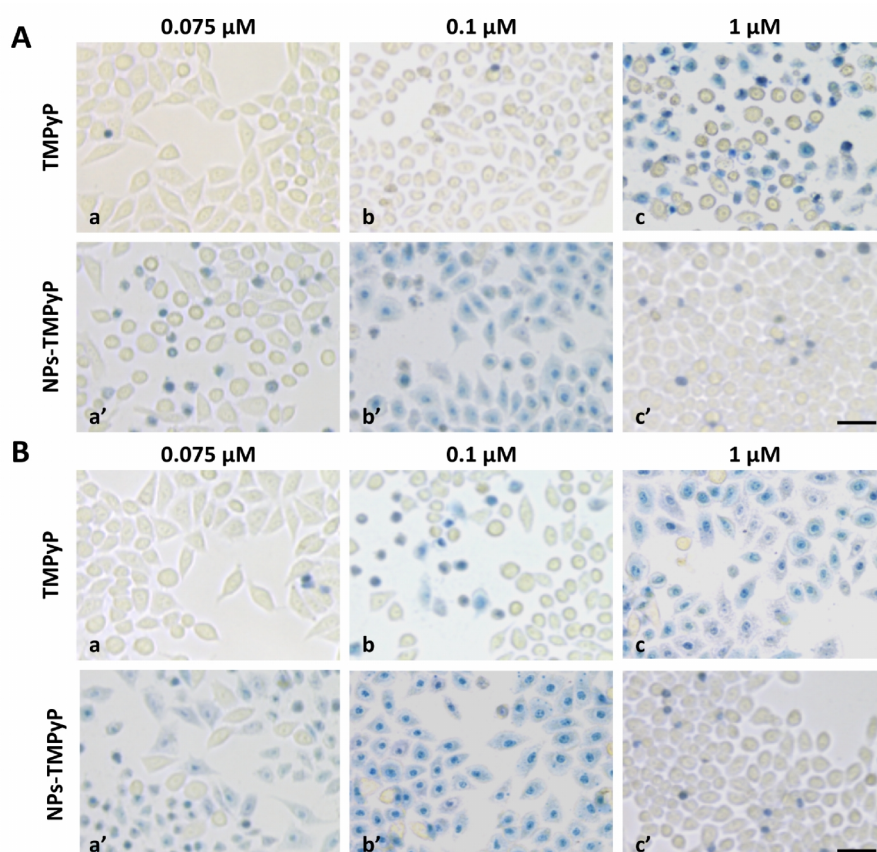


Figura 10. A: Células incubadas e irradiadas durante 10 min. a-c) Células incubadas 18 h con TMPyP (0.075, 0.1 y 1 μM , respectivamente). a'-c') Células incubadas 18 h con MSNPs-TMPyP (0.075, 0.1 y 1 μM , respectivamente). B: Células HeLa incubadas e irradiadas durante 15 min. a-c) Células incubadas 18 h con TMPyP (0.075, 0.1 y 1 μM , respectivamente). a'-c') Células tratadas con MSNPs-TMPyP (0.075, 0.1 y 1 μM , respectivamente). Barras de escala = 20 μm .

Los resultados obtenidos mediante el ensayo de exclusión del azul tripán, evidenciaron que el TMPyP incorporado en NPs de sílice era mucho más eficaz fotoinactivando células HeLa, que el FS administrado libremente; ya que se requieren concentraciones 10 veces inferiores ($0.1 \mu\text{M}$ vs $1 \mu\text{M}$) para alcanzar una inactivación prácticamente completa en las células HeLa, después de 15 min de irradiación (dosis de luz: 7.2 J/cm^2).

Por el contrario, cuando se aumentó la concentración de MSNPs-TMPyP a $1 \mu\text{M}$, se detectó una disminución muy evidente del porcentaje de células afectadas, posiblemente debido a que las NPs de sílice tienden a agregar en concentraciones elevadas, disminuyendo su eficacia de incorporación y/o eficacia de activación del FS que transportan.

1C.3 Análisis de las alteraciones de la morfología celular

Una vez realizados los ensayos de citotoxicidad, se analizaron las posibles alteraciones de la morfología celular inducidas por los distintos tratamientos, con el fin de corroborar los resultados de la viabilidad obtenidos mediante el test del azul tripán. Asimismo, se intentó identificar el mecanismo de muerte celular inducido por los tratamientos fotodinámicos más eficaces.

El análisis de las alteraciones inducidas en la morfología celular, se llevó a cabo empleando dos tipos de tinciones: **i)** rojo neutro (RN), para analizar la morfología general de las células, y **ii)** Hoechst-33258 (H-33258), para analizar la morfología nuclear. La Figura 11 muestra células incubadas tanto con TMPyP libre, como incorporado en NPs de sílice $0.1 \mu\text{M}$, sin posterior irradiación. Las células tratadas presentaron una morfología semejante a la de las células control: forma poligonal y aplanada, con un núcleo ovalado en cuyo interior se distinguen los nucléolos más teñidos.

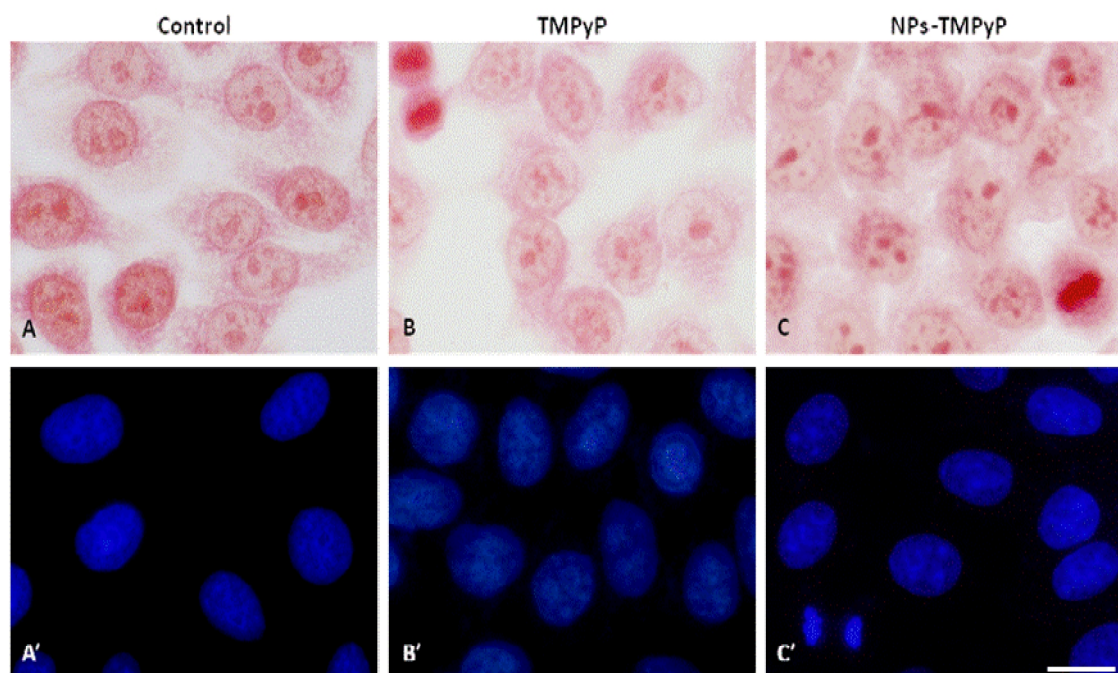


Figura 11. Toxicidad en la oscuridad. Células HeLa incubadas 18 h fijadas y teñidas con RN (A-C) y H-33258 (A'-C') a las 24 h. **A y A')** Células control. **B y B')** Células incubadas con TMPyP $0.1 \mu\text{M}$. **C y C')** Células tratadas con NPs-TMPyP $0.1 \mu\text{M}$. Barra de escala = $10 \mu\text{m}$.

Además, el número de células en mitosis de las muestras incubadas era similar al de las células control (~ 5%). En resumen, los tratamientos en ausencia de irradiación, no inducían ningún tipo de alteración morfológica en las células HeLa.

Por el contrario, los tratamientos en los que se procedió a una irradiación (de distintas dosis), después de la incubación con TMPyP y MSNPs-TMPyP evidenciaron, en algunos casos, notables cambios en la morfología de las células tratadas.

La Figura 12 muestra la morfología de células HeLa incubadas 18 h con TMPyP libre y TMPyP incorporado en MSNPs 0.075 y 0.1 μM , irradiadas con luz azul 10 y 15 min (4.8 y 7.2 J/cm^2), respectivamente; y teñidas con RN y H-33258. Como ya se comentó en el apartado 1C.2, la viabilidad celular se veía claramente afectada, en función del tiempo de irradiación y la concentración del FS; siendo mayor el efecto citotóxico en las células incubadas con el FS incluido en MSNPs.

Con una concentración de MSNPs-TMPyP de 0.075 μM y un tiempo de irradiación de 10 min, se detectó un 31% de células apoptóticas (ver Fig. 12A' y Tabla 1). Al aumentar la concentración a 0.1 μM y el tiempo de irradiación a 15 min, el porcentaje de células no viables aumentó hasta un 98% y las células presentaron una morfología necrótica (ver Fig. 12C' y Tabla 1). En los tratamientos fotodinámicos con el TMPyP administrado de manera libre, pocas células (menos del 1%) presentaron alteraciones morfológicas que indicaran una muerte por apoptosis.

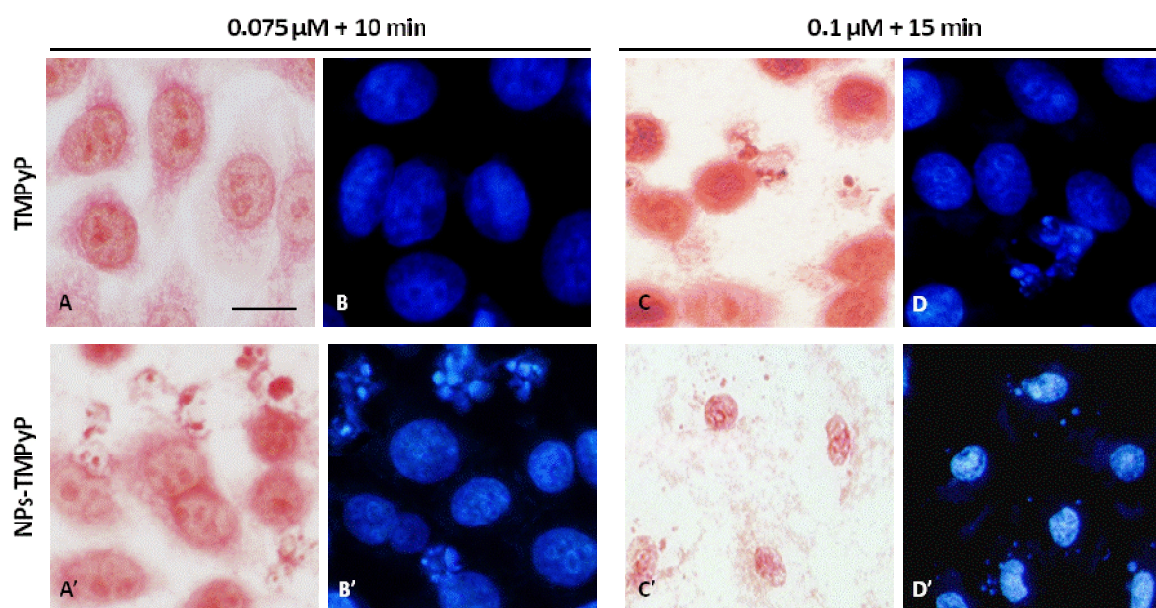


Figura 12. Células HeLa incubadas 18 h con TMPyP y MSNPs-TMPyP, irradiadas y teñidas con RN y H-33258. **A-D)** Células incubadas con TMPyP 0.075 y 0.1 μM e irradiadas 10 y 15 min, respectivamente. **A'-D')** Células incubadas con MSNPs-TMPyP 0.075 y 0.1 μM e irradiadas 10 y 15 min, respectivamente. Barra de escala = 10 μm .

Con el fin de cuantificar el efecto fotocitotóxico y el tipo de muerte inducido, en relación con las alteraciones morfológicas detectadas, se realizó un recuento en los distintos tipos de muestras. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1. Como se puede observar, los resultados relacionados con la inactivación celular, se corresponden con los obtenidos previamente con el ensayo del azul

tripán, evidenciando que el TMPyP inactiva con mayor eficacia a las células HeLa, cuando se incorpora en NPs de sílice que cuando se administra de forma libre.

Tabla 1. Porcentajes de células que presentan alteraciones morfológicas apoptóticas y/o necróticas después de ser incubadas con TMPyP ó MSNPs-TMPyP (0.075 μ M y 0.1 μ M), e irradiadas (10 y 15 min, respectivamente). Los datos corresponden a las medias de los recuentos de 1000 células procedentes de cinco experimentos distintos \pm la desviación estándar.

Muestras	% Células apoptóticas	% Células necróticas	% muerte (total)
Control	0.1 \pm 1.2	0	0.1 \pm 1.2
TMPyP 0.075 μ M + 10 min	1.6 \pm 1.7	0	1.6 \pm 1.7
MSNPs-TMPyP 0.075 μ M + 10 min	31.1 \pm 1.8	7.3 \pm 2.1	38.4 \pm 1.9
TMPyP 0.1 μ M + 15 min	10.9 \pm 2.5	2.9 \pm 1.9	13.8 \pm 2.2
MSNPs-TMPyP 0.1 μ M + 15 min	0	98.2 \pm 1.9	98.2 \pm 1.9

1C.4 Inmunofluorescencia indirecta para citocromo c

Para corroborar que la apoptosis era el mecanismo mayoritario de muerte desencadenado por el tratamiento con MSNPs-TMPyP 0.075 μ M y 10 min de irradiación azul (4.8 J/cm²), se llevó a cabo un marcaje del citocromo c mediante inmunofluorescencia indirecta, 6 h después de finalizar el tratamiento fotodinámico.

La Figura 13 muestra imágenes de células control (no tratadas) en las que se puede observar como el citocromo c está localizado en las mitocondrias. Sin embargo, parte de las células que habían recibido el tratamiento fotodinámico presentaban una fluorescencia verde difusa en el citoplasma, lo que indicaba una liberación del citocromo c desde las mitocondrias hacia el citosol. Esas mismas células poseían un núcleo con la cromatina claramente condensada y fragmentada (ver Fig. 13B). Asimismo, las imágenes obtenidas en campo claro mostraron que dichas células presentaban una clara reducción del volumen celular y deformaciones en la membrana plasmática (ver Fig. 13D).

El recuento de las células que mostraban las características morfológicas anteriormente comentadas, indicó que aproximadamente un 30% de las células tratadas con MSNPs-TMPyP (en las condiciones descritas anteriormente) se habían inactivado por apoptosis (Tabla 2). Es importante resaltar, que esta cifra se correlaciona con los datos de la Tabla 1.

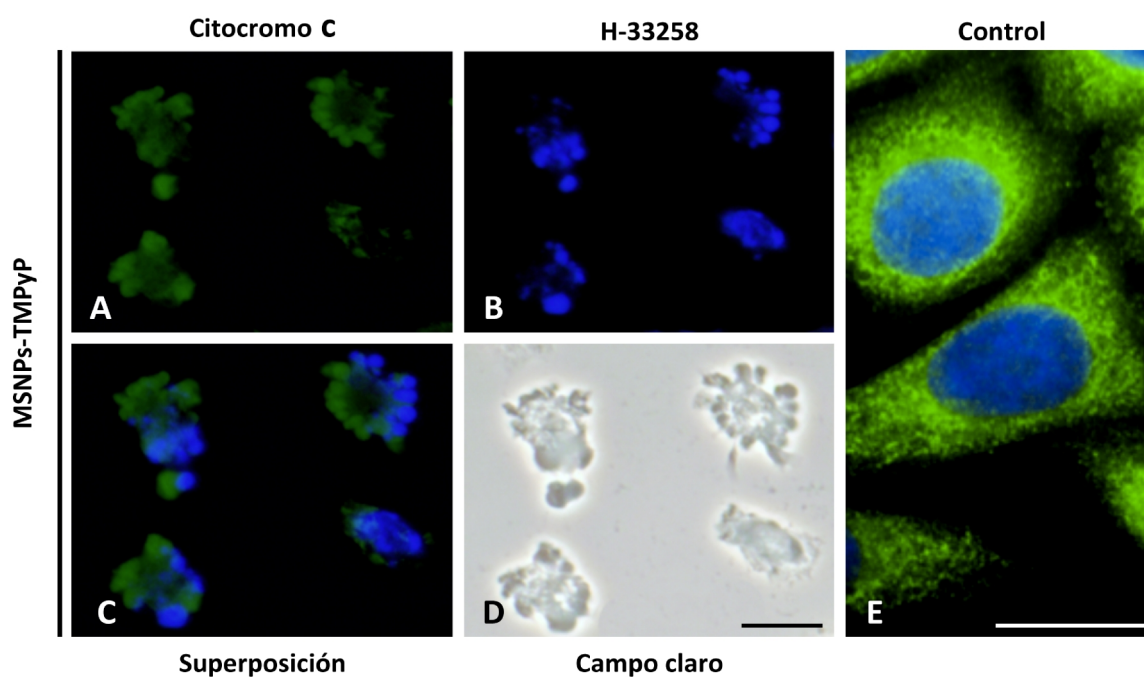


Figura 13. Inmunofluorescencia indirecta para citocromo c y contratinción de la cromatina con H-33258. **A-D)** Células incubadas 18 h con MSNPs-TMPyP 0.075 μ M e irradiadas 10 min, a las 6 h de dicho tratamiento. **E)** Células HeLa control (no incubadas ni irradiadas). Barra de escala = 10 μ m.

Tabla 2. Porcentajes de células que presentaban una relocalización de citocromo c y la cromatina condensada y fragmentada. Los datos corresponden a las medias de los recuentos de 1000 células procedentes de tres experimentos distintos \pm la desviación estándar.

Muestras	% de células con citocromo c relocalizado y cromatina fragmentada \pm DE
Control	0.07 \pm 0.21
MSNPs-TMPyP 0.075 μ M + 10 min	29.81 \pm 1.52

2. Ensayos realizados en células B78H1 y en ratones C57BL/6

El presente estudio ha supuesto el primer análisis en profundidad sobre la capacidad de inactivación de células tumorales en cultivo y de tumores *in vivo*, empleando la combinación de dos FSs: ZnPc y TMPyP, con dosis de TFD inferiores a las comúnmente empleadas.

La ZnPc se administró, por ser altamente hidrofóbica, en una formulación liposomal de dos fosfolípidos: 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina (OOPS), con una composición de relación ZnPc/POPC/OOPS (1:90:10 w/w/w). El TMPyP se administró directamente en su forma libre (no vehiculizada) al ser un FS hidrofílico.

Toda la parte experimental *in vivo* fue realizada por la Doctoranda durante su estancia en el laboratorio del Prof. Jori, mientras que el procesamiento de las muestras se realizó mayoritariamente en el Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC). El ensayo TUNEL fue realizado por la Doctoranda, y tanto la captura de imágenes como la evaluación de las mismas, se llevó a cabo por parte de la Doctoranda y su Directora de Tesis.

2A. Evaluación del efecto inducido por ZnPc + TMPyP en células B78H1

2A.1 Efecto de la TFD combinada sobre la viabilidad celular

La primera fase del estudio se realizó utilizando la línea celular tumoral **B78H1** (un clon amelanótico derivado del melanoma murino B16). Primeramente, se procedió a analizar la supervivencia celular después de los distintos tratamientos fotodinámicos, en la línea celular murina B78H1, ya que sería el tipo celular que se inyectaría subcutáneamente en los ensayos *in vivo* utilizando ratones C57BL/6.

La Figura 1 muestra los resultados de la evaluación de la citotoxicidad mediante el ensayo colorimétrico del MTT. El efecto sobre la **viabilidad celular**, se determinó, tanto a las 24 como a las 48 h después de cada tratamiento. El análisis evidenció que la incubación durante 1 h con **ambos FSs**, seguida de 10 min de irradiación con luz roja de intensidad 4 mW/cm² (dosis total de luz 2.4 J/cm²), inducía un efecto letal sobre la viabilidad de las células B78H1, muy similar al observado en las anteriores líneas celulares humanas analizadas (fracción de supervivencia celular a las 24 y 48 h: 2 ± 1% y 1 ± 1%, respectivamente). Por el contrario, los tratamientos fotodinámicos con **un sólo FS** no afectaban significativamente la viabilidad celular. Del mismo modo, se comprobó que la **irradiación** roja por si sola (sin preincubación con FS) no inducía efectos fototóxicos, ya que los datos de supervivencia en las células expuestas a una dosis total de luz de 2.4 J/cm², fueron similares a los de las células control, ni incubadas ni irradiadas (datos no mostrados). Asimismo, no se observó ningún efecto citotóxico en los experimentos llevados a cabo en **ausencia de irradiación** o dark toxicity (datos no mostrados). Es decir, el tratamiento combinado con los dos FSs, no inducía toxicidad en oscuridad (el valor de supervivencia celular fue superior al 90% en todos los casos).

Sólo el tratamiento combinado produjo efectos altamente significativos (****) sobre la supervivencia de las células B78H1 en relación a todos los demás grupos ensayados. Los datos representados corresponden a los valores medios ± DE (desviación estándar) de al menos seis experimentos diferentes. Las diferencias estadísticamente significativas se etiquetaron como *P<0.05,

P<0.01 ó **P<0.0001, para las comparaciones realizadas entre grupos mediante un ANOVA de una vía con el test post-hoc de comparación múltiple de Tukey.

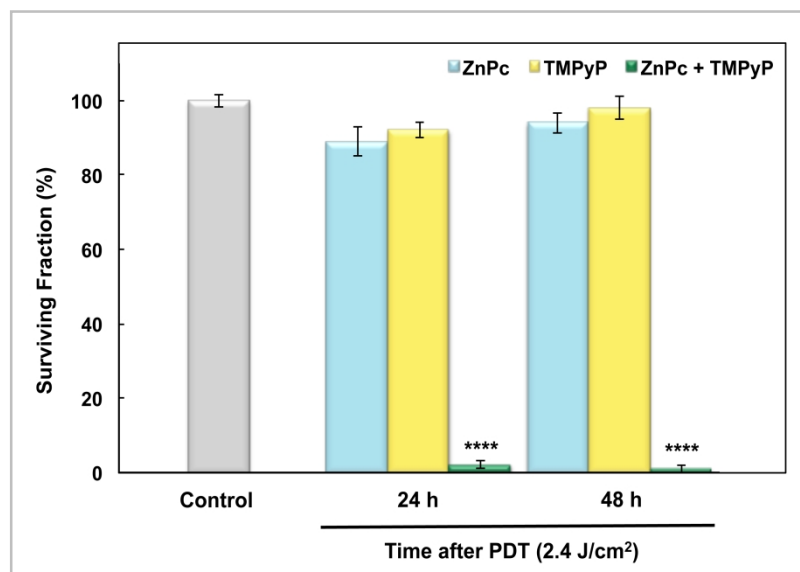


Figura 1. Comparación de la supervivencia de las células B78H1, 24 y 48 h después de un tratamiento de 1 h y 2.4 J/cm² de irradiación.

El efecto del tratamiento fotodinámico combinado (células incubadas con ambos FSs durante 1 h + 2.4 J/cm² de dosis de luz) sobre la viabilidad de las células B78H1 se pudo definir como **sinérgico**, aplicando el método de Valeriote y Lin (explicado en el apartado de materiales y métodos) (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto sinérgico del tratamiento fotodinámico combinado a las 24 (azul) y 48 h (rojo), según el método de Valeriote y Lin.

Línea celular	[A + B]	[A] x [B] / 100	Efecto del tratamiento
B78H1	2 ± 1	82 ± 3	Sinérgico
B78H1	1 ± 1	92 ± 3	Sinérgico

Nota: A indica la viabilidad celular para el tratamiento fotodinámico con ZnPc, B con TMPyP, y A + B para el tratamiento combinado con ambos FSs.

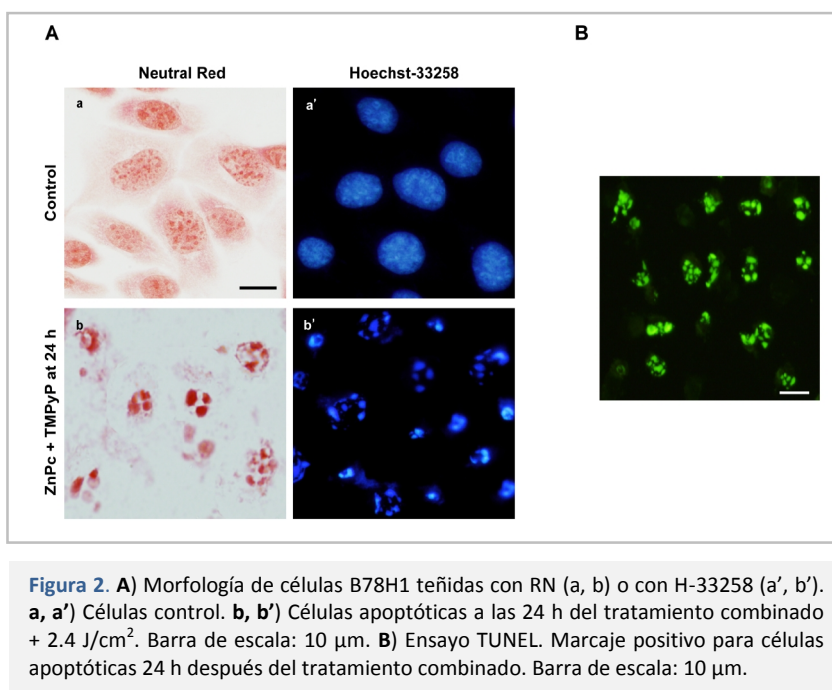
2A.2 Identificación del mecanismo de fotoinactivación

Antes de proceder con los ensayos *in vivo*, se identificó el mecanismo de muerte desencadenado en las células B78H1 por el tratamiento combinado con los dos FSs, empleando las siguientes pruebas: tinción con rojo neutro (para el análisis de la morfología general), tinción con Hoechst 33258 (para la evaluación de la morfología nuclear), y ensayo TUNEL (para la identificación de células apoptóticas).

Las células tratadas con un sólo con FS o únicamente irradiadas (2.4 J/cm²) presentaron una morfología similar a la de las células B78H1 control (imágenes no mostradas). Sin embargo, después del

tratamiento fotodinámico sinérgico 1 h con 5×10^{-8} M de ZnPc + 10^{-6} M de TMPyP + 2.4 J/cm^2 , las células mostraron notables cambios morfológicos típicos de la apoptosis, en función del intervalo de tiempo transcurrido después de finalizar el tratamiento (3, 6, 18, 24 y 48 h). Debido a la elevada cantidad de datos analizados, en la presente Tesis doctoral únicamente se incluyen imágenes de células B78H1 a las 24 h después del tratamiento combinado. Como se muestra en las Figuras 2Ab y 2Ab', a las 24 h del tratamiento, en la mayoría de las células se había desencadenado la apoptosis, ya que mostraban: retracción celular, condensación de la cromatina, y fragmentación nuclear, todas ellas, características típicas de este mecanismo de muerte celular.

Asimismo, los resultados obtenidos con el **ensayo TUNEL** nos permitieron detectar *in situ* las células apoptóticas y corroborar la inducción de esta ruta de muerte. En las células control y las sólo irradiadas, observamos un marcaje TUNEL negativo, incluso forzando al máximo la sensibilidad del microscopio para capturar las imágenes. De este modo, se confirmó que la simple irradiación con luz roja no inducía la vía apoptótica (datos no mostrados).



Tampoco se observó señal fluorescente en las células tratadas con ambos FSs y analizadas **3 y 6 h** después del tratamiento fotodinámico (datos no mostrados), lo que indica que la fragmentación internucleosomal del ADN, todavía no se había producido.

Por el contrario, se obtuvo un marcaje TUNEL positivo en prácticamente todas las células procesadas **24 h** después del tratamiento (ver Fig. 2B), lo que indicaba que las células B78H1 entran en apoptosis, pero esta vía de muerte se desarrolla más lentamente que por ejemplo en células HeLa, donde ya se observaba un marcaje TUNEL positivo a las 6 h.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos mediante la tinción con H-33258, donde se constató que la típica condensación y fragmentación apoptótica se producía a las 24 h.

2A.3 Desorganización del citoesqueleto y de la proteína de adhesión vinculina

Para completar los estudios del análisis de las alteraciones morfológicas desencadenadas después del tratamiento sinérgico, se procedió a estudiar la posible desorganización inducida en el citoesqueleto así como en algunas proteínas implicadas en la adhesión celular. La Figura 3 muestra los resultados obtenidos en microscopía de fluorescencia confocal de la morfología de los **microtúbulos** (MTs) realizado mediante inmunofluorescencia indirecta para α -tubulina-FITC, seguida de una contratinción con H-33258. Las células B78H1 control en interfase mostraban una disposición radial de los MTs, distribuidos por toda la célula. Las células sometidas al tratamiento fotodinámico sinérgico, presentaban una progresiva desorganización de la red de los MTs interfásicos, especialmente marcada a las **24 h** después de finalizar el tratamiento, donde el marcaje de los MTs quedaba reducido a un débil punteado asociado a los núcleos con la cromatina condensada y fragmentada (ver Fig 3b). Por el contrario, las células tratadas con un único FS, sólo irradiadas, o incubadas con ambos FSs pero sin irradiar, mostraron una distribución similar a la de las células control (imágenes no mostradas).

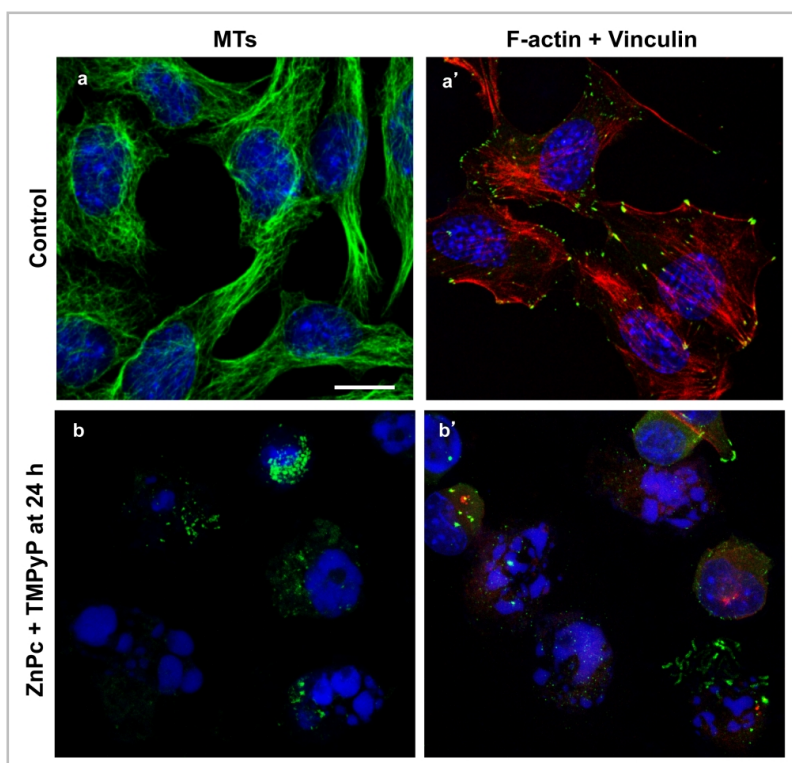


Figura 3. Inmunofluorescencia indirecta de microtubulos (verde) y contratinción con H-33258 (azul). **a)** Control B78H1. **b)** Células 24 h después del tratamiento apoptótico. Visualización del marcaje de F-actina (rojo), vinculina (verde) y contratinción con H-33258 (azul). **a')** Células control. **b')** Células 24 h después del tratamiento sinérgico. Barra de escala: 10 μ m.

Para obtener una mayor información sobre los mecanismos de inactivación celular, se investigaron las alteraciones inducidas por la TFD combinada en los **microfilamentos de actina** (MFs) y en la proteína **vinculina**, que están implicados en la adhesión celular. Dichos efectos se analizaron mediante la tinción con faloidina conjugada con rodamina e inmunofluorescencia indirecta para

vinculina, respectivamente, seguida de una contratinción con H-33258. La Figura 3 muestra la secuencia de eventos relacionados con los MFs de actina y la vinculina asociados a la muerte celular por apoptosis. Como se puede apreciar, las células B78H1 control mostraron fibras de estrés (MFs de actina) recorriendo el citoplasma, así como fibras corticales, que finalizaban en los contactos focales (placas de adhesión). Precisamente, en esta diferenciación de la membrana plasmática se localiza la proteína vinculina, implicada en la adhesión celular. A las **18 h** del tratamiento, las células presentaban una clara alteración en la distribución tanto de los MFs de actina, claramente asociada al cambio en la morfología celular detectada previamente mediante microscopía óptica, como de la proteína vinculina. Además, los núcleos de las células presentaban una cromatina fuertemente condensada (datos no mostrados). Transcurridas **24 h**, los MFs aparecían completamente desorganizados y únicamente se detectó un marcaje puntual cerca del núcleo. De forma simultánea, se manifestó una gran pérdida en la expresión de vinculina y los núcleos presentaron una morfología típicamente apoptótica (ver Fig 3b').

2B. Evaluación del efecto inducido por la TFD combinada *in vivo*

La segunda fase del estudio consistió en inducir tumores subcutáneos en ratones C57BL/6 mediante la inyección de un 10^6 células de melanoma amelanótico murino (B78H1).

Los primeros estudios *in vivo* se realizaron en colaboración con el Dr. Julio Gutiérrez (del Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología de Madrid), para evaluar las propiedades de localización tumoral de la ZnPc y del TMPyP.

Para ello, una vez desarrollado el tumor (unas dos semanas después de la inyección subcutánea de las células B78H1), se procedió a inyectar en la vena caudal de la cola, la ZnPc a una concentración de 0.5 mg/kg, y/o el TMPyP a una concentración de 4.1 mg/kg, de masa corporal. Transcurridos distintos intervalos de tiempo (1, 3, 24 y 48 h) de la inyección intravenosa (i.v.), se analizó la distribución de ambos FSs, por captura de imagen y procesamiento de las mismas con el software ImageJ (lookup table: fire). Las imágenes mostraron una acumulación intensa y selectiva de los FSs en la región tumoral. La mayor fluorescencia se detectó a las 24 h de la inyección (Figura 4). Los ratones control inyectados con PBS sólo mostraron un mínimo fondo de fluorescencia, en todos los intervalo de tiempo analizados.

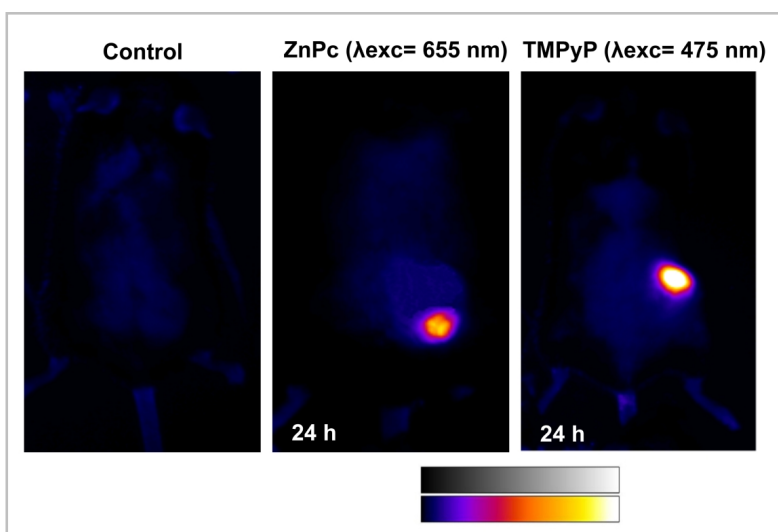


Figura 4. Imágenes de fluorescencia de la acumulación *in vivo* de cada FS tomadas 24 h después de la i.v. Se indican las longitudes de onda de excitación para cada FS. Código de colores para la intensidad de fluorescencia: blanco> amarillo> naranja> rojo> morado> azul> negro. El ratón control se inyectó sólo con PBS.

Los ensayos *in vivo* posteriores se llevaron a cabo en el laboratorio del Prof. Jori (Universidad de Padua, Italia).

En primer lugar, se procedió a analizar la **farmacocinética** de ambos FSs. La biodistribución de cada FS inyectado por vía i.v., se determinó espectrofluorimétricamente después de su extracción química a partir de muestras de tejidos homogeneizados, incluyendo: el tumor, zonas de la piel próximas al tumor, el hígado, el bazo y los riñones, los pulmones, el cerebro y el suero sanguíneo. Se prestó especial atención en la determinación del intervalo de tiempo necesario para alcanzar la mayor concentración del FS en el tumor, para realizar la irradiación en el momento más adecuado.

Para los diferentes protocolos de estudio de la farmacocinética de ambos FSs o los ensayos de TFD, se utilizaron las siguientes concentraciones: ZnPc 0.5 mg/kg = 0.9 μ M/kg y TMPyP 4.1 mg/kg = 3.6 μ M/kg. Se analizó la cinética de acumulación de ambos FSs inyectados tanto de forma individual como de manera combinada. Se utilizaron 8 ratones por grupo de tratamiento. Para cada FS se recogieron muestras a los siguientes intervalos (Δt) = 1, 3, 24 y 96 h, después de la inyección de cada FS. Para medir la emisión de fluorescencia de la ZnPc, la muestra se excitó a 610 nm y se recogió la emisión de fluorescencia de 630 a 800 nm. En el caso del TMPyP, la longitud de onda de excitación fue de 420 nm y la de emisión de fluorescencia de 650-720 nm.

Los resultados obtenidos después de extrapolar los valores usando una recta de calibración adecuada para cada FS, fueron los siguientes. En el caso de la **ZnPc** (ver Fig. 5), a las 96 h después de la inyección casi no se apreciaron restos del FS en el suero sanguíneo lo que indicaba una rápida eliminación del organismo. No se observó a ningún Δt , ZnPc en el cerebro o en la piel, lo que indicaba que no atraviesa la barrera hematoencefálica y que no generaría fotosensibilidad cutánea.

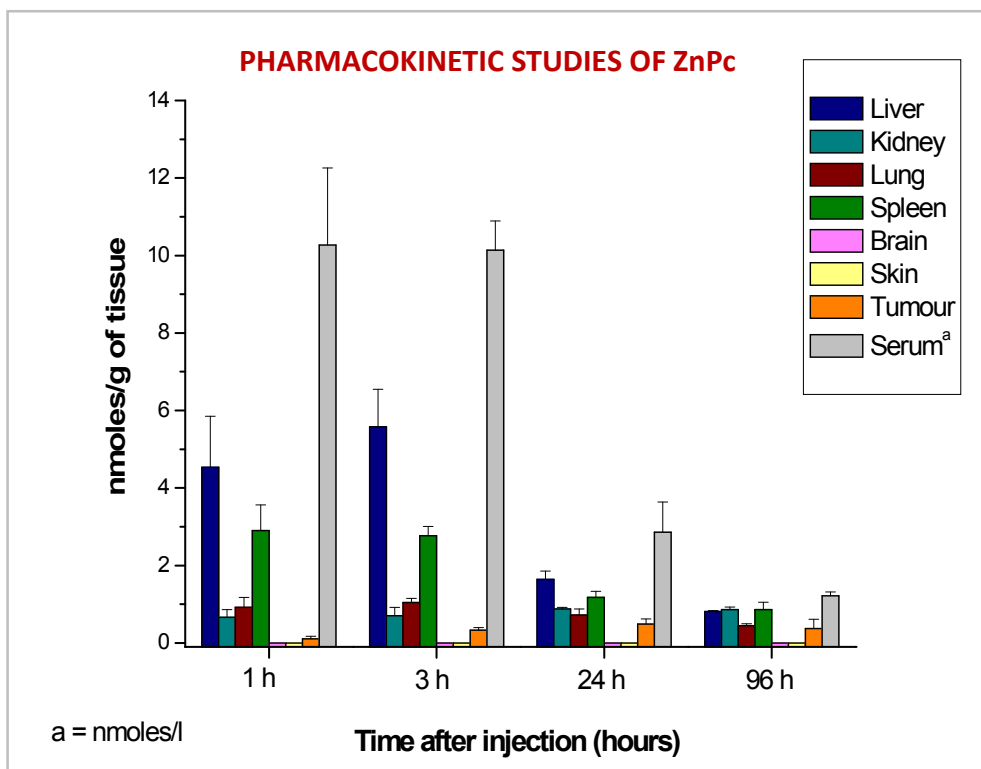


Figura 5. Recuperación de ZnPc en el suero y distintos órganos a distintos intervalos de tiempo después de la i.v. de 0.5 mg/kg de ZnPc.

La máxima acumulación de ZnPc se obtuvo en el hígado y en el bazo a las 3 h de la inyección (5.58 y 2.77 nmoles/g, respectivamente), lo que demuestra su principal vía de eliminación, pero fue disminuyendo gradualmente alcanzando niveles próximos a 0 a las 96 h. En el tumor se alcanzaron importantes niveles de ZnPc, siendo su máxima acumulación en el área tumoral a las 24 h (0.49 nmoles/g).

Cuando se comparó el nivel de acumulación de ZnPc en el área tumoral y en la piel de la zona peritumoral, se observó una elevada especificidad de este FS por el área tumoral (ver Fig. 6).

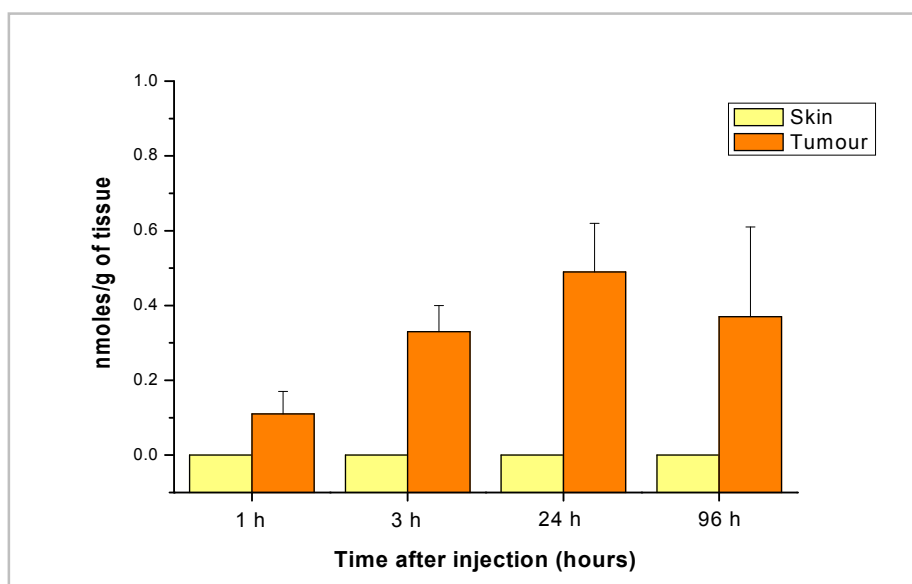


Figura 6. Detalle de la farmacocinética de acumulación de la ZnPc en la piel y en el área tumoral.

En relación con la biodistribución del **TMPyP**, el panel A de la Figura 7 muestra que a las 96 h de la i.v. no se detectaron niveles de este FS en el suero sanguíneo, aunque sí en el hígado y en los riñones (4.95 y 1.50 nmoles/g, respectivamente). Asimismo, no se detectó TMPyP en el cerebro o en el bazo, a ninguno de los Δt seleccionados. Además, el TMPyP se acumulaba en mayor medida que la ZnPc, en la piel de la zona peritumoral, indicando que su especificidad por el área tumoral, era menor. Sin embargo, a las 24 h el nivel de acumulación del TMPyP en la piel ya es casi inapreciable (0.16 nmoles/g), lo que indicaría un mínimo riesgo de fotosensibilización cutánea después de la PDT. Pequeñas cantidades de FS se encontraron en el pulmón, especialmente en los intervalos de tiempo cortos posteriores a la inyección, probablemente debido a la posible captura de partículas coloidales por los capilares pulmonares. La máxima acumulación del TMPyP se obtuvo en el hígado y en los riñones, indicando que son las principales vías de eliminación de este compuesto.

Como se muestra en el panel B de la Figura 7, la especificidad del TMPyP por la zona tumoral fue menor que para la ZnPc pero aún así, se alcanzaban niveles importantes de TMPyP, siendo su máxima acumulación en el área tumoral a las 3 h de la inyección (1.24 nmoles/g), aunque también se detectó a las 24 h.

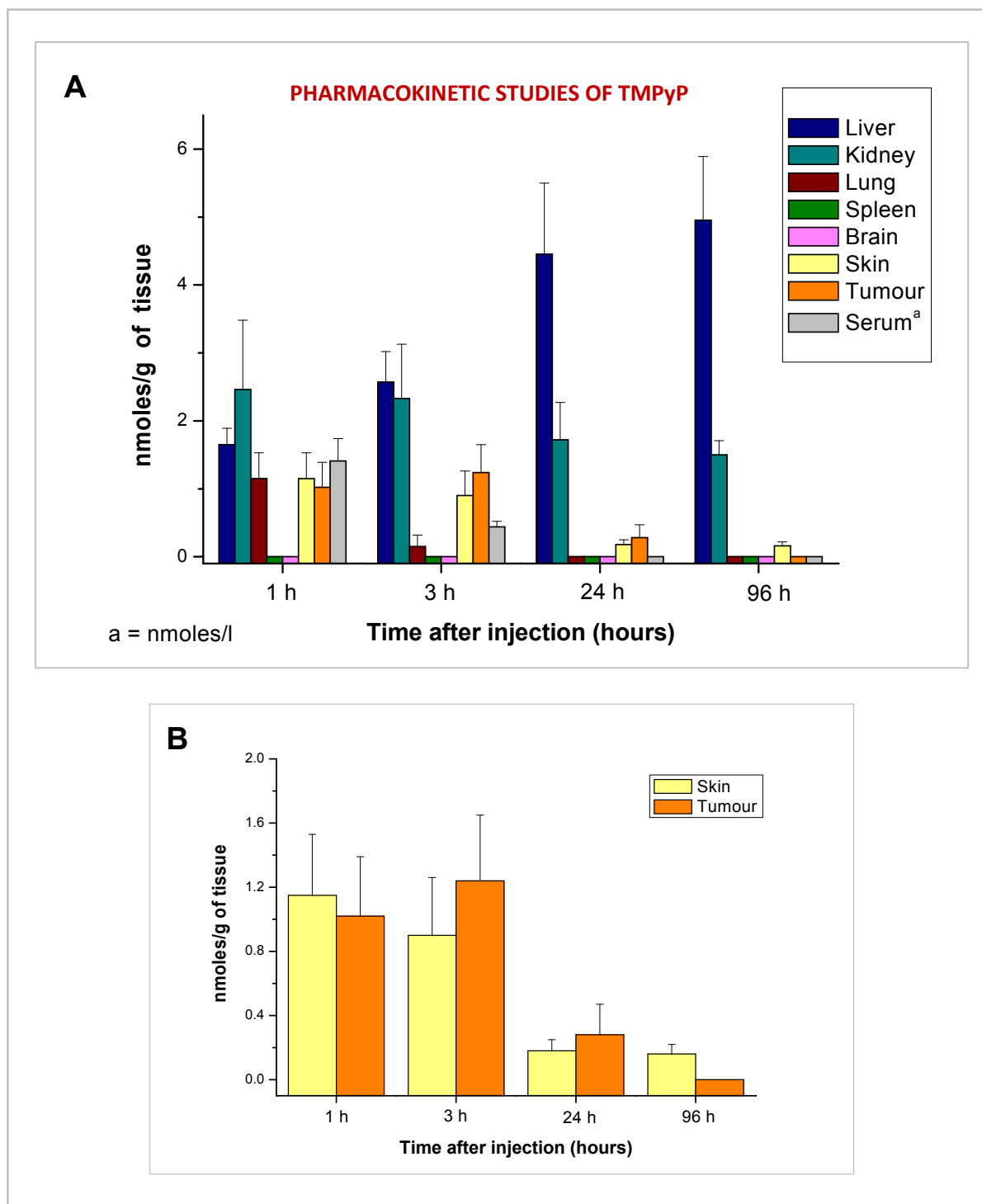


Figura 7. A: Acumulación del TMPyP en el suero sanguíneo y diversos tejidos seleccionados de ratones C57BL/6 portadores de un melanoma amelanótico. Los ratones fueron inyectados i.v. con 4.1 mg/kg TMPyP. **B:** Farmacocinética comparativa del TMPyP en la piel y en el área tumoral.

Estos resultados del TMPyP en su conjunto, indicaban que si se irradiaba el área tumoral 1 ó 3 h después de la inyección i.v., se podría favorecer un efecto de la TFD a través del daño a la vasculatura de la lesión neoplásica, un hecho menos probable a intervalos de tiempo posteriores ya que no es detectable TMPyP en el suero sanguíneo a las 24 h.

En el caso de la **farmacocinética combinada** sólo se analizaron muestras a las **3 y 24 h** después de la inyección ya que eran los Δt más interesantes después de haber realizado la farmacocinética individual de cada FS. La Figura 8 muestra que a las 24 h la concentración de **ZnPc** en el suero sanguíneo fue casi la misma que cuando se inyectaba individualmente (ZnPc individual: 2.86 nmoles/l y combinada con el TMPyP: 2.35 nmoles/l). Resultados en la misma línea se obtuvieron para el resto de los órganos analizados. De hecho, La máxima acumulación de la ZnPc en la zona tumoral se detectó de nuevo a las 24 h con un valor de 0.33 nmoles/g.

En relación al **TMPyP**, tampoco se observaron diferencias significativas en los distintos órganos analizados, cuando se inyectaba de manera combinada en relación a cuando se administraba de manera individual. El TMPyP repitió el mismo patrón de acumulación-eliminación que cuando se inyectó de manera individual.

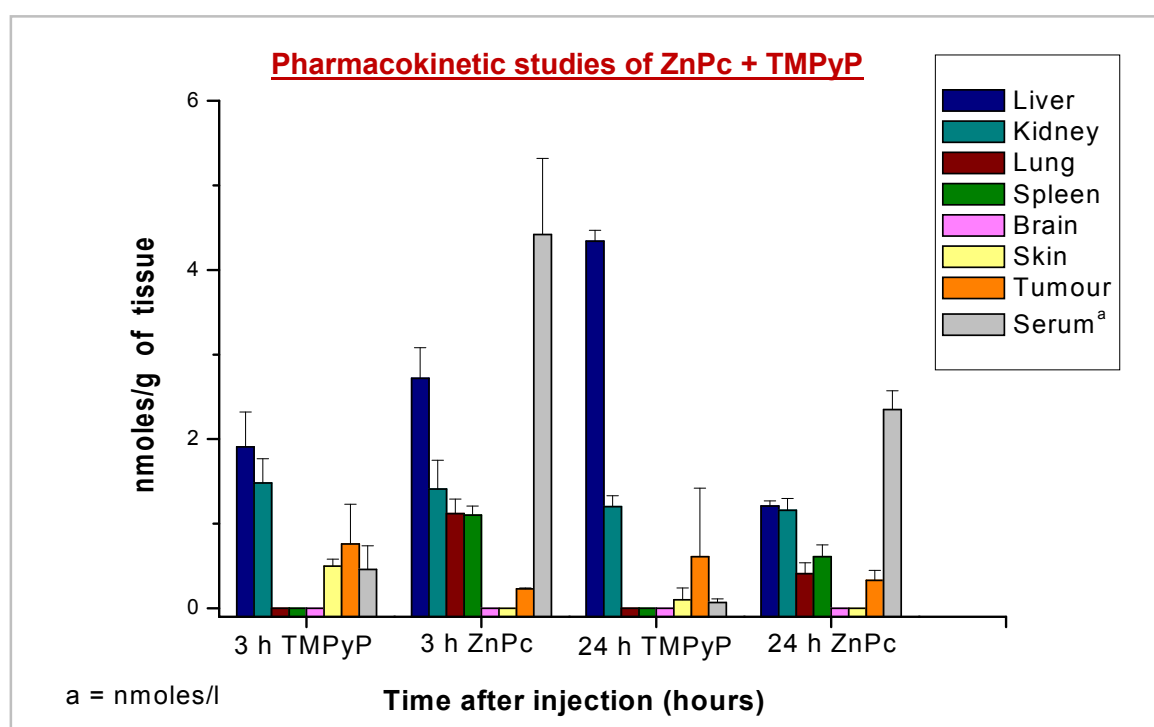


Figura 8. Recuperación de ZnPc y TMPyP a partir del suero sanguíneo y tejidos seleccionados de ratones C57BL/6 portadores de un melanoma amelanótico trasplantado subcutáneamente. Los ratones fueron inyectados i.v. con 0.5 mg/kg ZnPc + 4.1 mg/kg TMPyP.

De nuevo, a las 24 h los niveles de TMPyP en el suero sanguíneo eran prácticamente indetectables (0.07 nmoles/l). La mayor concentración de TMPyP en el área tumoral se obtuvo a las 3 h. Sin embargo, a las 24 h de inyectarse de manera conjunta con la ZnPc, se obtuvo una mayor concentración (0.61 nmoles/g), que inyectado de manera individual (0.28 nmoles/g). Un dato que concuerda con los resultados observados en el análisis de localización tumoral realizado previamente.

En la Figura 9 se muestra que cuando los FSs eran inyectados de manera conjunta, la **ZnPc** conservaba su acumulación preferencial en el área tumoral y no en la piel, con un valor máximo de 0.33 nmoles/g a las 24 h. En relación al **TMPyP**, se consiguió una mayor acumulación a las 24 h que cuando se inyectaba de manera individual (0.61 nmoles/g), disminuyendo su acumulación en la piel.

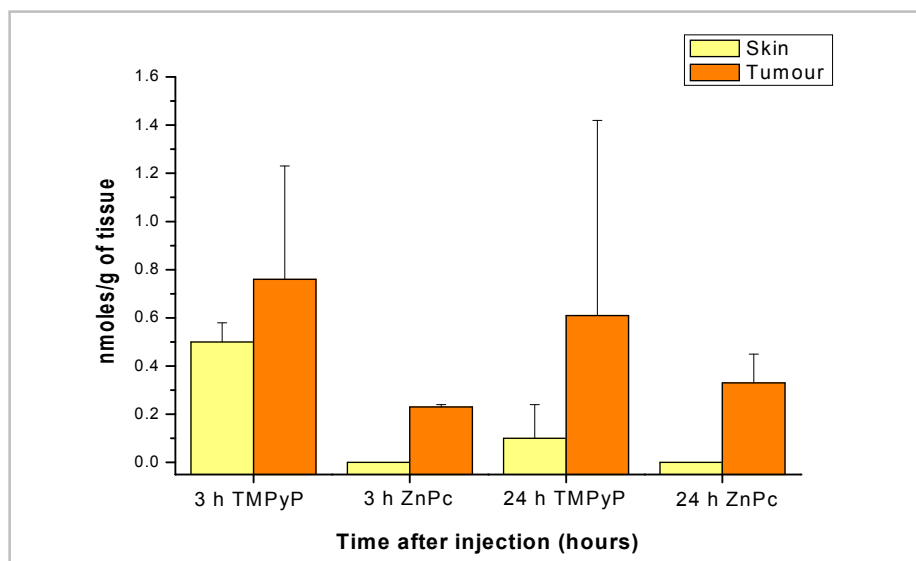


Figura 9. Detalle de la farmacocinética de acumulación de la ZnPc y del TMPyP inyectados de manera combinada, en la piel y en el área tumoral.

Una vez completado el estudio sobre la farmacocinética de cada FS inyectado i.v. tanto de manera individual como combinada y basándonos en los datos obtenidos, se evaluó la **actividad antitumoral *in vivo*** de la estrategia de TFD combinada en este modelo murino.

De nuevo, a los 10-15 días después de la inyección subcutánea de las células B78H1, se procedió a inyectar por vía i.v. (vena caudal), la ZnPc en una concentración de 0.5 mg/kg y/o el TMPyP a una concentración de 4.1 mg/kg, de masa corporal. Transcurridas **3 ó 24 h después de la inyección**, cuando una cantidad significativa de FS estaba aún presente en el suero sanguíneo ó para permitir la acumulación de los FSs en la lesión neoplásica, se procedió a anestesiarse a los animales con Zoletil® + Xilor® antes de someterlos a la irradiación. La irradiación se realizó usando una longitud de onda de 600-700 nm, con una tasa de fluencia de 175 mW/cm², y una dosis total de luz de 300 J/cm². La eficacia del tratamiento se evaluó mediante la comparación de la tasa de crecimiento del tumor, en función del tiempo, después de la irradiación de ratones fotosensibilizados vs la observada para los ratones control (que no habían sido expuestos a la luz, ni inyectados con ningún FS). Es importante destacar que la irradiación + el tratamiento combinado, provocaba una herida necrosada que generaba una costra, la cual se curaba en una semana.

Como puede observarse en la Figura 10, el melanoma amelanótico crece de forma muy agresiva en los ratones control, lo que eventualmente conduce a la muerte de estos animales portadores de tumores después de aproximadamente 3 semanas. Sin embargo, en nuestros experimentos, los ratones fueron sacrificados mediante eutanasia, cuando el volumen del tumor alcanzó los 0.8 cm³, de acuerdo con las normas recomendadas por el comité de ética de la Universidad de Padova para minimizar el sufrimiento innecesario de los animales.

En la Figura 10 (paneles A y B) se muestra una respuesta tumoral claramente significativa y un retraso, en el crecimiento tumoral, para todos los tratamientos de TFD realizados, tanto con los FSs administrados individualmente como combinados, en relación al grupo control. La irradiación (300 J/cm²) se llevó a cabo a dos tiempos diferentes: 3 y 24 h después de la correspondiente inyección.

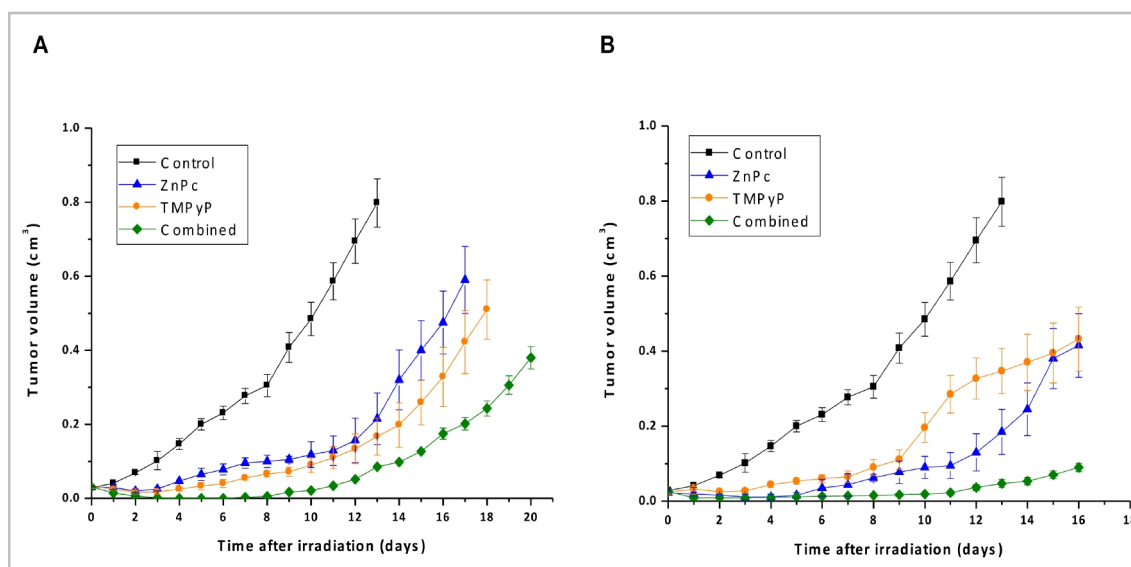


Figura 10. Gráficas del volumen tumoral medio (cm^3) de ratones C57B/6 portadores de un melanoma amelanótico trasplantado subcutáneamente, después de la TFD (300 J/cm^2) a las 3 (A) y 24 h (B) después de la inyección i.v. de 0.5 mg/kg de ZnPc y/o 4.1 mg/kg de TMPyP. El grupo control representa un control absoluto (sin irradiar y sin fármaco). Los valores representados corresponden a la media \pm desviación estándar, de 6-8 ratones.

En ambos casos, el crecimiento tumoral posterior a la TFD, fue apreciablemente más rápido en los ratones tratados sólo con un FS (ZnPc ó TMPyP), que en el caso de la terapia combinada, y ambas respuestas tumorales se solaparon a los 13 días de la finalizar los tratamientos individuales.

Por el contrario, la terapia combinada con ambos FSs fue claramente el tratamiento más eficaz, induciendo un retraso significativo en el crecimiento tumoral y una significativa supervivencia de los animales.

Tomando un volumen tumoral medio de 0.4 cm^3 como punto de partida, se pudo observar, a partir de las gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier realizadas con el programa GraphPad Prism (ver Fig. 11 (A y B), una significativa ventaja en la supervivencia para los ratones sometidos a la TFD combinada a 3 y 24 h después de la inyección de ambos FSs, respectivamente.

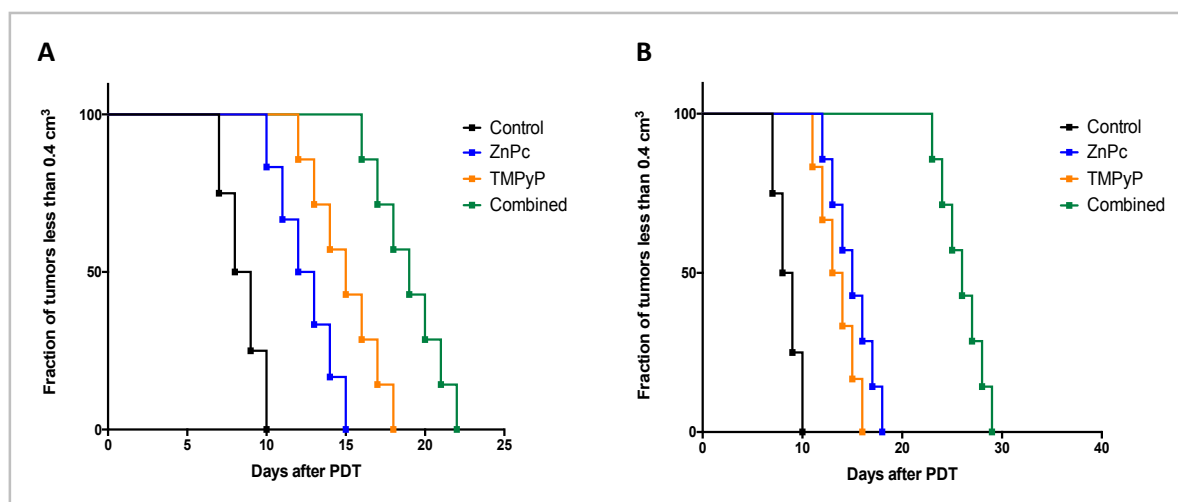


Figura 11. Gráficas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones C57B/6 portadores de un melanoma amelanótico trasplantado subcutáneamente, después de la TFD (300 J/cm^2) a las 3 (A) y 24 h (B) después de la inyección i.v. de 0.5 mg/kg de ZnPc y/o 4.1 mg/kg de TMPyP. El grupo control representa un control absoluto (sin irradiar y sin fármaco).

El recrecimiento de los tumores a partir de los días 10 o 12 (3 y 24 h de intervalo de tiempo entre inyección e irradiación, respectivamente), probablemente se debía a la proliferación de un pequeño número de células tumorales, no inactivadas por el tratamiento de TFD, algo en cierto modo esperable ya que los animales fueron sometidos a un sólo ciclo de TFD.

No se observaron diferencias significativas en la supervivencia o en el aumento del volumen tumoral entre los diferentes grupos control: control en la oscuridad (inyección de cada FS de manera individual o combinada, pero sin luz roja), control de luz (sin fármaco) y control absoluto (sin luz y sin fármaco), por lo que sólo se representa gráficamente el control absoluto para clarificar el análisis de los resultados obtenidos.

Dentro de los estudios *in vivo*, también se recogieron muestras de los tumores (tratados y sin tratar) para diversos procesamientos. Parte de las mismas, se procesaron para su análisis al microscopio electrónico de transmisión (Transmission Electron Microscopy, TEM). Otras, fueron analizadas histológicamente, tanto mediante una tinción con hematoxilina-eosina (H-E), como con un ensayo TUNEL (fluorescencia y campo claro). Las muestras se recogieron a distintos intervalos de tiempo: 6, 24 y 72 h, después del correspondiente tratamiento.

En relación al estudio mediante **TEM**, se analizó el tejido tumoral de tres ratones tratados de forma independiente, para cada intervalo de tiempo post-tratamiento seleccionado. En general, se encontró una buena correlación entre las diferentes muestras de cada animal. Debido a la gran cantidad de muestras analizadas, en la presente Tesis Doctoral sólo se presentan los resultados de los tratamientos de TFD realizados 3 h después de las correspondientes inyecciones intravenosas. Además, conviene destacar que precisamente las muestras correspondientes al tratamiento sinérgico de 72 h, se procesaron para el MET con mayor dificultad que el resto, por lo que la calidad de las imágenes capturadas ha sido inferior. Por esta misma razón, los resultados no han sido tan concluyentes como esperábamos.

Típicamente, los tumores de los ratones C57BL/6 control (Fig. 12a y 12b) se componen de células muy cohesionadas entre sí, con forma poligonal o ligeramente alargada. Poseen un núcleo con la cromatina laxa y nucleolos prominentes, mientras que el citoplasma presentaba algunos perfiles de retículo endoplasmático rugoso y mitocondrias dispersas. También se visualizaron capilares que se caracterizaban por la presencia de un fino endotelio.

Las características ultraestructurales de los tumores aislados de los ratones que recibieron el tratamiento con: ZnPc, TMPyP o ZnPc + TMPyP, pero que no fueron irradiados, fueron esencialmente idénticas a las observadas en los ratones no tratados (datos no mostrados). Estos resultados confirmaban que, ni la ZnPc ni el TMPyP, inducían alteraciones detectables en la morfología de las células del melanoma amelanótico, es decir, no inducían toxicidad en la oscuridad. De forma similar, no se observó ninguna modificación apreciable, en las muestras obtenidas de ratones expuestos a la irradiación, sin inyección previa de cualquiera de los agentes FSs mencionados.

La Figura 12c muestra como **6 h** después de la TFD combinada, sólo se apreciaron alteraciones menores en las células neoplásicas, aunque algunos eritrocitos estaban extravasados. Las alteraciones morfológicas fueron mucho más marcadas y evidentes a las **24 h**, donde se observó un daño más pronunciado (ver Fig. 12d). Las células presentaban el citoplasma bastante desorganizado y la cromatina muy condensada. También se detectó un incremento de la extravasación de eritrocitos, por rotura de

capilares. Es importante resaltar, que numerosas células presentaban una gran vacuola de contenido vacío al MET, en una zona muy focalizada junto a la envoltura nuclear (indicada con una flecha en la Fig. 12d).

A las **72 h** del tratamiento, el tejido neoplásico presentaba morfologías muy variadas. En algunas muestras, era de tipo hemorrágico con un gran número de eritrocitos extravasados como consecuencia del daño endotelial. Asimismo, se observaron células neoplásicas con una extensa vacuolización citoplasmática, y orgánulos celulares bastante desorganizados. La cromatina estaba condensada contra la envoltura nuclear en algunas células, y se detectó la presencia de posibles cuerpos apoptóticos (señalados con flechas en la Fig. 12f). También se observaron células con morfología necrótica.

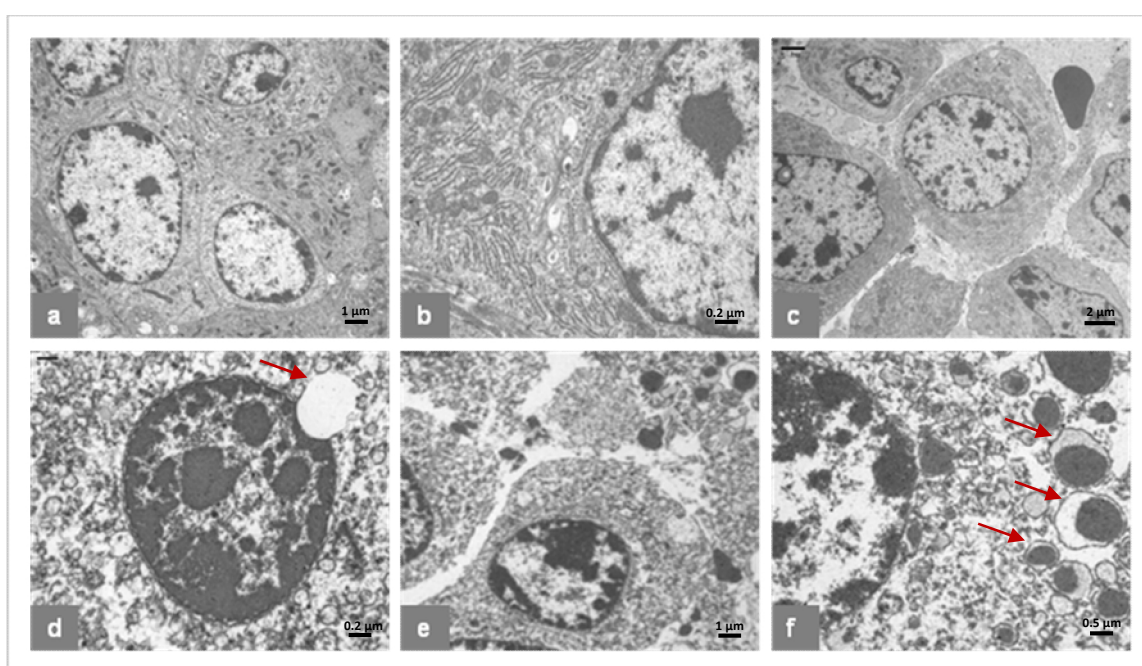


Figura 12. Imágenes de TEM obtenidas a partir de secciones de muestras de tumores (melanoma amelanótico, B78H1) de ratones control y tratados con la TFD combinada, a las 3 h de la inyección de ambos FSs. **a, b)** Ultraestructura de tumores control, con distinto aumento. **c-f)** Secciones de tumores tratados con TFD de muestras recogidas a: las 6 h (**c**), 24 h (**d**) y 72 h (**e, f**) después de finalizar la irradiación.

Por otra parte, y mediante la **tinción con H-E** se confirmaron las alteraciones morfológicas visualizadas al TEM y descritas anteriormente. Cabe destacar el elevado número de células con morfología apoptótica, que se detectaron a las 72 h después del tratamiento combinado, como se muestra en la Figura 13d (señaladas con flechas).

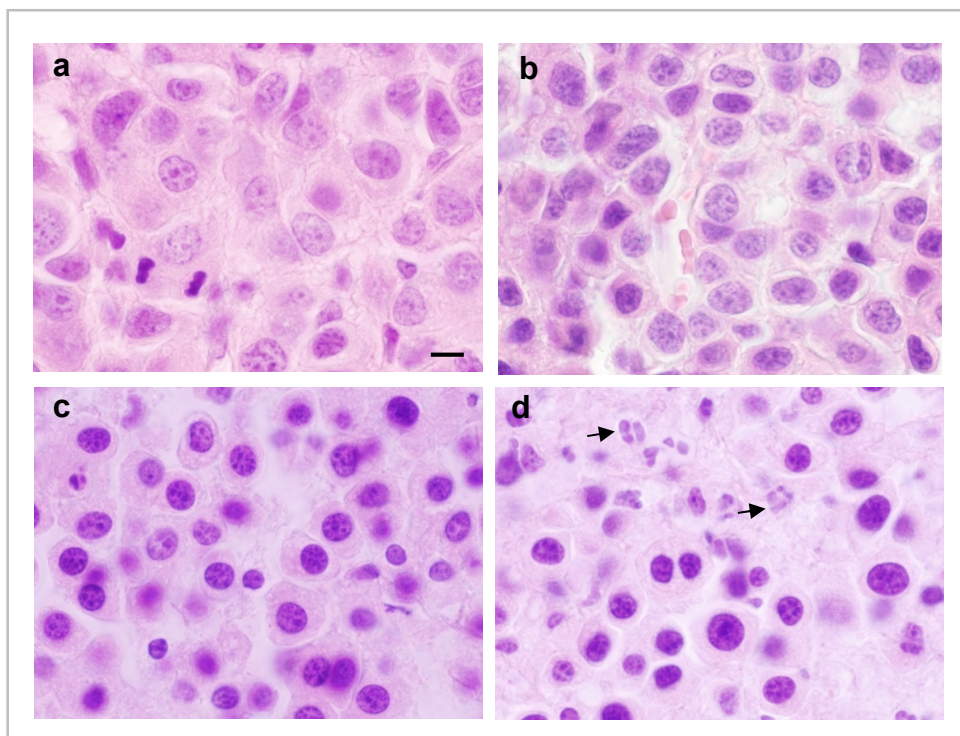


Figura 13. Fotografías de secciones de muestras de tumores de ratones control y tratados con la TFD combinada, irradiadas a las 3 h después de la inyección. Tinción H-E. **a)** Muestra de ratones control no tratados, mostrando una figura mitótica. **b-d)** Secciones de tumores de ratones inyectados con 0.5 mg/kg ZnPc + 4.1 mg/kg TMPyP e irradiados. Las imágenes corresponden a muestras recogidas a las 6, 24 y 72 h después de finalizar la TFD, respectivamente. Barra de escala: 10 μ m.

Por último, y con el fin de corroborar la inducción de la apoptosis como el mecanismo de muerte principal desencadenada después de la TFD combinada, se realizó un **ensayo TUNEL** en secciones histológicas de tumores de ratones (controles y tratados).

Las muestras se observaron, tanto en microscopía de campo claro, como de fluorescencia. Imágenes representativas de ambos tipos de análisis se muestran en las Figuras 14 y 15.

Tanto en microscopía de campo claro como de fluorescencia, las secciones de tumores de ratones control mostraron un marcaje TUNEL negativo (Fig 14a y Fig. 15a'). Tampoco se observó señal positiva en los tumores tratados con ambos FSs y analizados **6 h** después del tratamiento fotodinámico, y la señal en las muestras de **24 h** fue positiva sólo en algunas células dispersas (datos no mostrados). Por el contrario, se obtuvo un marcaje TUNEL positivo en prácticamente todas las células de la muestra correspondiente a las **72 h** después del tratamiento combinado (ver Fig. 14b y 15d').

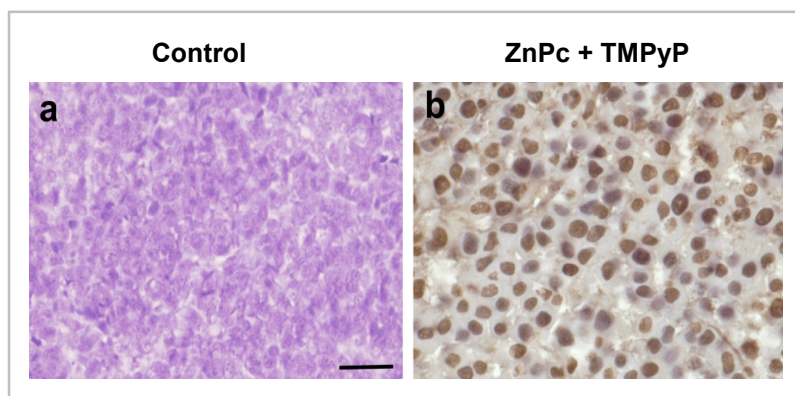


Figura 14. Imágenes en microscopía de campo claro del ensayo TUNEL. **a)** Tumor control. **b)** Secciones de tumores de ratones inyectados con 0.5 mg/kg de ZnPc + 4.1 mg/kg de TMPyP + 300 J/cm². Barra de escala: 20 μm.

En la Figura 15d', se han señalado con flechas algunos núcleos claramente apoptóticos, con la cromatina condensada y fragmentada. Las muestras procedentes de ratones irradiados (300 J/cm²) a las 3 h de la inyección de ZnPc ó TMPyP (sin combinar) y procesadas 72 h después de finalizar dicho tratamiento, dieron una débil señal TUNEL positiva sólo en algunas células aisladas, lo que confirma la eficacia del tratamiento combinado *in vivo*.

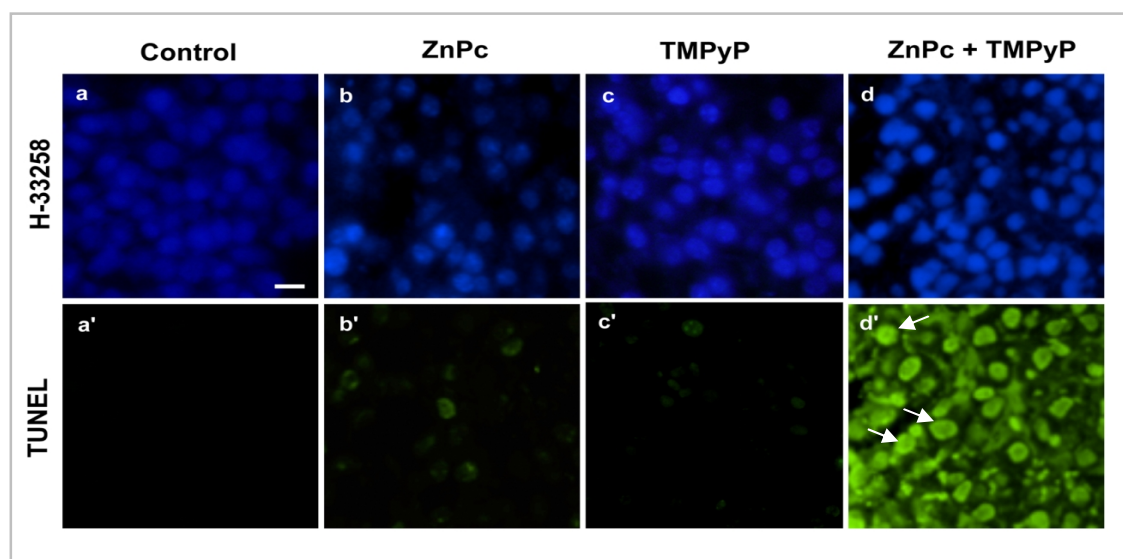


Figura 15. Imágenes en microscopía de fluorescencia del ensayo TUNEL + contratinción con H-33258, de muestras fijadas 72 h después de finalizar la TFD. **a, a')** Secciones de ratones control no tratados. **b, b')** Secciones de tumores de ratones inyectados con 0.5 mg/kg de ZnPc + 300 J/cm². **c, c')** Secciones de tumores de ratones inyectados con 4.1 mg/kg de TMPyP + 300 J/cm². **d, d')** Secciones de tumores de ratones inyectados con 0.5 mg/kg de ZnPc + 4.1 mg/kg de TMPyP + 300 J/cm². Barra de escala: 10 μm.

Tomados en su conjunto, los resultados obtenidos *in vivo* refuerzan la eficiente actividad antitumoral de la TFD combinada y apoyan la teoría de que este tipo de terapia podría proporcionar tasas curativas sinérgicas sobre los tratamientos fotodinámicos convencionales (con un único FS). Obviamente, protocolos experimentales distintos (concentraciones y/o tiempos de irradiación superiores, u otra combinación de FSs), y/o bien ciclos de TFD combinada repetidos, permitirían alcanzar regresiones completas a largo plazo, que no se han podido llevar a cabo en el presente estudio.

3. Ensayos realizados en cultivos celulares 3D

El último objetivo de la presente Tesis Doctoral fue realizar una aproximación a diferentes modelos celulares 3D y evaluar en ellos diversos protocolos de TFD. Los resultados obtenidos relacionados con este objetivo, se han dividido en dos bloques, en función de los protocolos experimentales llevados a cabo.

3A. Cultivos celulares 3D en Matrigel™

El primer programa de trabajo en 3D se llevó a cabo en el grupo de investigación en TFD de la Prof. Hasan (Wellman Center for Photomedicine, Harvard Medical School). Los primeros estudios estuvieron centrados en la puesta a punto de la técnica de cultivos 3D en Matrigel™ para dos líneas celulares: OVCAR-5 (procedente de un adenocarcinoma de ovario humano) y MIA PaCa-2 (procedente de un adenocarcinoma humano de páncreas).

La Figura 1 evidencia que estos andamios proteicos inspirados en la MEC, resultaron muy adecuados para imitar el microambiente de los sistemas *in vivo*, ya que se formaban nódulos de más de 200 μm de diámetro (aproximadamente a los 10 días). Los resultados obtenidos en microscopía óptica de campo claro y de campo oscuro, permitieron analizar el tamaño y el número de los nódulos formados, en función del tiempo transcurrido desde la siembra de las células (desde el 3er día hasta el día 20).

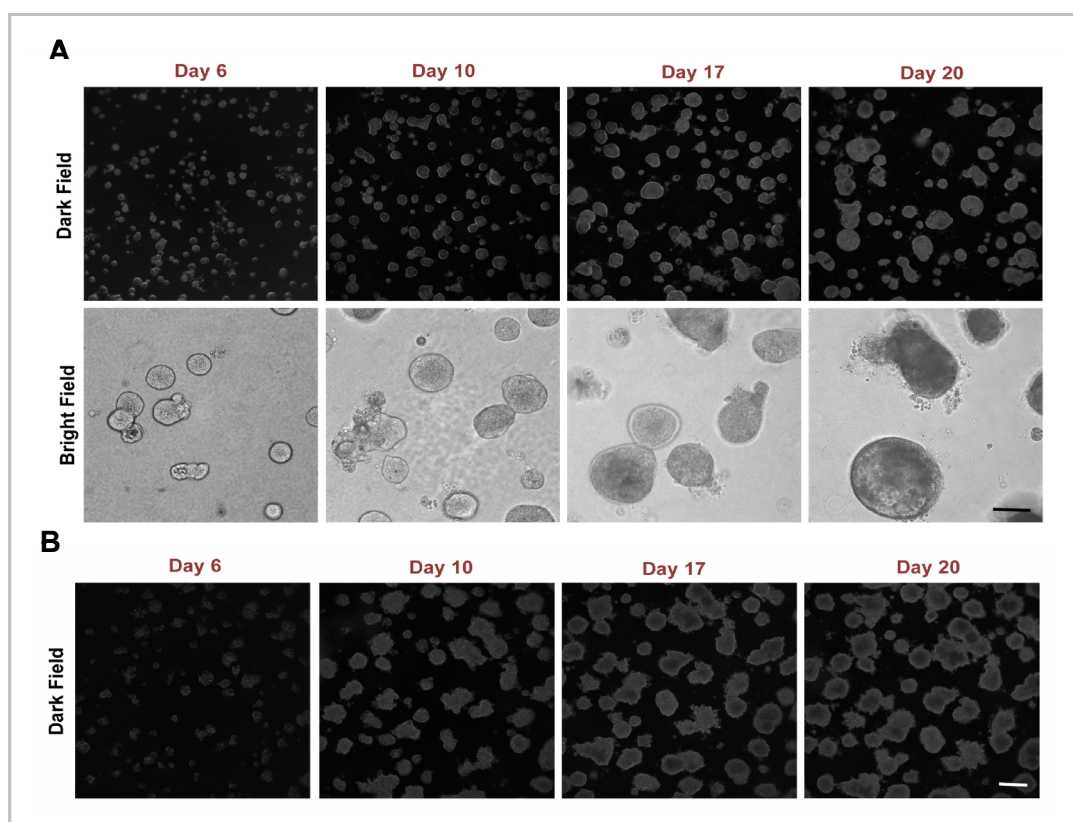


Figura 1. A: Imágenes de microscopía óptica de campo oscuro (objetivo x5) y de campo claro (objetivo x20) de un cultivo 3D de células OVCAR-5. Barra de escala: 200 μm . **B:** Imágenes de microscopía óptica de campo oscuro (objetivo x5) de un cultivo 3D de células MIA PaCa-2. Barra de escala: 200 μm .

Posteriormente, se llevaron a cabo tratamientos fotodinámicos en los cultivos 3D de células OVCAR-5. Los resultados obtenidos, mediante el ensayo de viabilidad (Live/Dead) con bromuro de etidio (que marca las células no viables y emite fluorescencia roja) y calceína (marca las células viables y emite fluorescencia verde), se muestran en la Figura 2.

Como se puede observar, la supervivencia de las células en los cultivos 3D controles fue de un 99%, mientras que 24 h después del tratamiento fotodinámico con $0.25 \mu\text{M}$ de BPD-MA + 5 J/cm^2 , la supervivencia celular se redujo prácticamente al 50%. También se incluyó en el estudio un grupo de células control (no tratado) y un grupo de control de muerte (fijando las células 2 min con formalina al 2% y permeabilizándolas con tritón 0.05%), para asegurar que los reactivos funcionaban adecuadamente. Se tomaron imágenes mediante microscopía confocal y se analizaron con el software MATLAB.

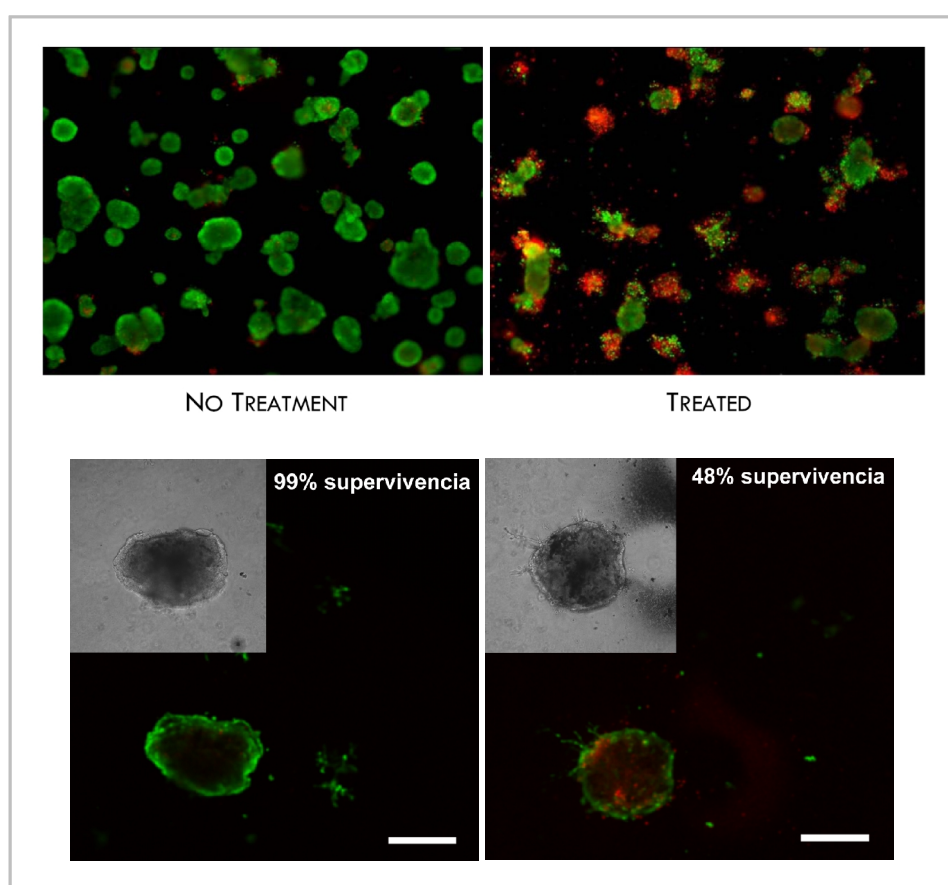


Figura 2. Imágenes de microscopía confocal del ensayo Live/Dead en células OVCAR-5, 24 h después del tratamiento de TFD con BPD-MA. Barra de escala: $250 \mu\text{m}$.

Por último, se pusieron a punto, con notable éxito, distintos protocolos de inmunofluorescencia para las células MIA PaCa-2 en cultivos 3D. Concretamente, los estudios se llevaron a cabo para el inmunomarcaje de las proteínas: Bcl-xL, colágeno IV, fibronectina y E-cadherina, simultáneamente con vimentina. En la Figura 3 se muestran imágenes representativas tomadas en microscopía confocal, para la doble inmunofluorescencia de E-cadherina (fluorescencia verde) y vimentina (fluorescencia roja). Los

núcleos se contratiñeron con DAPI y también se capturaron imágenes en microscopía óptica de contraste de fase. Claramente observamos como las células MIA PaCa-2 habían dejado de expresar una proteína específica de las células epiteliales, la E-cadherina y sin embargo, habían inducido la expresión de marcadores mesenquimales como es la proteína vimentina. Este es un resultado clásico que se observa durante la transición epitelio-mesénquima que ocurre en muchas células tumorales y que fuimos capaces de detectar en los cultivos 3D.

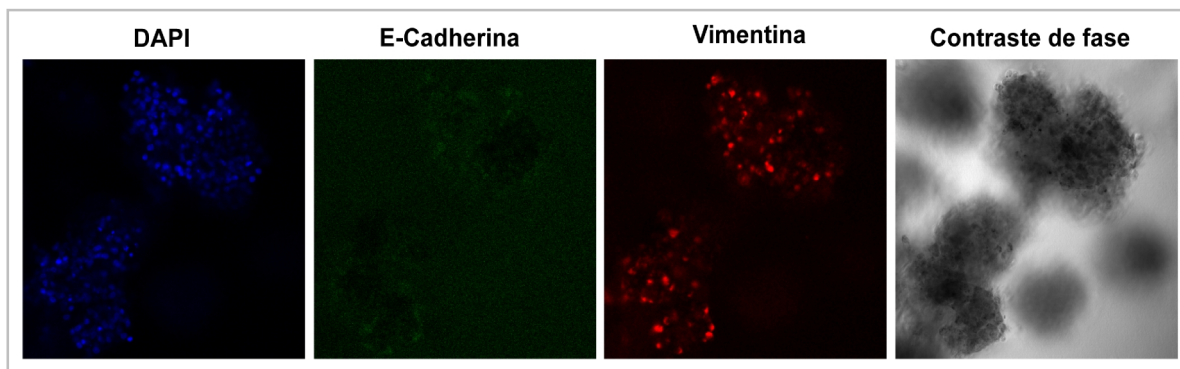


Figura 3. Inmunofluorescencia indirecta para E-cadherina y vimentina en cultivos 3D de células MIA PaCa-2. Imágenes tomadas mediante microscopía confocal.

3B. Cultivos celulares 3D en matrices de colágeno I y del péptido RAD16-I

El segundo programa de trabajo centrado en los 3D, se llevó a cabo en el grupo de investigación de Medicina Regenerativa del Dr. Semino (Institut Químic de Sarrià de la Universitat Ramon Llull, Barcelona), con dos modelos celulares 3D diferentes. Uno de ellos está basado en el uso de andamios proteicos de colágeno y el otro en el uso de un hidrogel del péptido autoensamblable RAD16-I (conocido comercialmente como BDTM PuraMatrixTM), que forma una red de nanofibras interconectadas de 10-20 nm de diámetro y con un tamaño de poro de 50-200 nm.

A continuación, se comentan los resultados de la respuesta a diferentes tratamientos de TFD realizados en cultivos 3D de colágeno o de RAD16-I, de células HeLa, fibroblastos humanos neonatales de la dermis (hNDF) o cocultivos de ambas líneas celulares. Los parámetros seleccionados para la realización de los tratamientos de TFD (concentración de los FSs, tiempo de incubación, dosis de luz), se basaron en los resultados obtenidos previamente durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, utilizando la combinación de dos FSs: ZnPc y TMPyP.

En la Figura 4 se muestran imágenes obtenidas en microscopía confocal, de muestras de cultivos 3D con el péptido RAD16-I, formados sólo por células HeLa, sólo por células hNDF o cocultivos de ambas líneas celulares (50% HeLa + 50% hNDF).

Los microfilamentos de las células de estos cultivos 3D, se marcaron con faloidina conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Faloidina-FITC), y los núcleos se contratiñeron con DAPI. De esta manera se caracterizó morfológicamente cada modelo 3D. Es importante señalar que las células HeLa presentaron una morfología más redondeada que los fibroblastos, tanto en las muestras formadas únicamente por células HeLa como en las muestras de cocultivos. Este hecho, nos permitió

diferenciarlas fácilmente de los fibroblastos, ya que éstos mostraban una morfología alargada con fibras de estrés muy pronunciadas que recorrían toda la célula. Asimismo detectamos que la morfología de las colonias de células HeLa que crecían sobre andamios proteicos en 3D, variaba en relación a la morfología de las colonias en 2D, donde las células HeLa son más poligonales y aplanadas. A nivel morfológico, utilizando la microscopía óptica, no se apreciaron diferencias entre los cultivos 3D de RAD16-I y de colágeno (imágenes no mostradas).

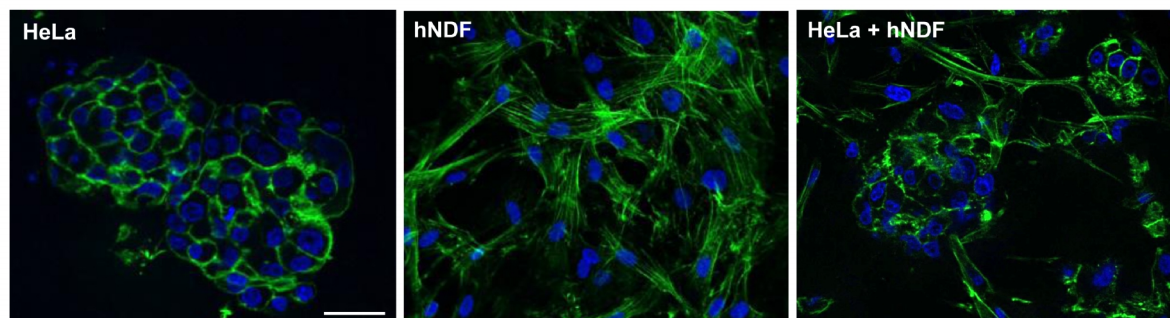


Figura 4. Marcaje de los microfilamentos de actina mediante una tinción con faloidina-FITC y contratinción de los núcleos con DAPI, en cultivos 3D (RAD16-I) de células HeLa, hNDF o cocultivo de ambas líneas celulares. Imágenes tomadas mediante microscopía confocal. Barra de escala: 50 μ m.

A continuación, se realizaron diferentes tratamientos fotodinámicos, tanto en cultivos 3D de RAD16-I como de colágeno, para comparar la eficacia de inactivación celular de nuestro tratamiento combinado (ZnPc + TMPyP + irradiación) en cultivos 2D o *in vivo*, en relación a los cultivos 3D.

Las **fracciones de supervivencia** celular de los cultivos **2D** se compararon con las obtenidas después de los tratamientos de TFD en **3D**, utilizando las mismas condiciones experimentales que en líneas celulares en monocapa. Para ello, se incubaron los cultivos 3D con ZnPc (5×10^{-8} M) + TMPyP (10^{-6} M) durante 1 h y se irradiaron con una dosis de luz roja de 3.6 J/cm^2 , que era la dosis de luz más elevada utilizada en los ensayos en cultivos 2D (efecto letal).

Como se muestra en la Figura 5, el tratamiento realizado bajo las condiciones denominadas *in vitro*, no indujo ningún efecto citotóxico en ninguna línea celular de los dos modelos de cultivos 3D, lo que indicaba que las dosis de TFD requeridas para inactivar células tumorales en cultivos 3D, debían ser más elevadas que para la fotosensibilización de cultivos 2D.

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo colorimétrico del MTT y por citometría de flujo empleando SYTOX® blue (sonda que se une con una alta afinidad solo al ADN de las células muertas que han perdido la integridad de su membrana plasmática).

Posteriormente, se incubaron los cultivos 3D, tanto los de RAD16-I como los de colágeno, con las concentraciones de FSs utilizadas para los ensayos realizados *in vivo* en ratones C57BL/6. Para ello, se incubaron las células (HeLa, hNDF y cocultivos) durante 3 h con ZnPc (0.9 μ M), TMPyP (3.6 μ M) o con ambos FSs simultáneamente, y se irradiaron con una dosis de 70 J/cm^2 . Esta dosis de luz era claramente inferior a la utilizada en los ensayos realizados *in vivo* (300 J/cm^2), debido a que la fuente de irradiación era distinta. Además, tuvimos en cuenta que los cultivos 3D deberían estar 3 h fuera del incubador (durante la irradiación) y no queríamos que este factor pudiera influir en los resultados.

En la Figura 5A, se muestran los resultados de viabilidad obtenidos mediante el ensayo del MTT en los cultivos de RAD16-I para las 3 líneas celulares utilizadas. Como se puede observar, solamente el

tratamiento combinado con ZnPc + TMPyP seguido de 70 J/cm^2 de irradiación, indujo un efecto citotóxico altamente significativo sobre la supervivencia de las 3 líneas celulares, aunque la viabilidad fue algo superior en el caso de los fibroblastos.

Sin embargo, en los tratamientos individuales, tanto el TMPyP como la ZnPc inducían una citotoxicidad claramente menor, lo que confirmaba la eficacia del tratamiento combinado de ambos FSs.

Debido al elevado número de muestras analizadas y para abreviar los resultados obtenidos, en la Figura 5B se han representado únicamente los valores de las matrices de **colágeno** con 100% de fibroblastos y con cocultivos, ya que en el análisis de las matrices de RAD16-I observamos un comportamiento muy similar entre los cultivos sólo de células HeLa y los cocultivos.

En el caso de las matrices de colágeno, los resultados obtenidos en los tratamientos con sólo TMPyP fueron similares a los obtenidos en las matrices de RAD16-I. Sin embargo, observamos diferencias entre los tratamientos con sólo ZnPc o el tratamiento combinado. De este modo pudimos comprobar que a la hora de comparar resultados sobre la eficacia terapéutica de un tratamiento concreto, influyen tanto el tipo de matriz 3D como la línea celular que se utilicen.

Por otra parte, ambos cultivos celulares (hNDF o cocultivos) fueron más sensibles a los tratamientos de TFD con ZnPc ó ZnPc + TMPyP, con una dosis de luz de 70 J/cm^2 , que en el caso de las matrices de RAD16-I, por lo que disminuimos la dosis de luz a 50 J/cm^2 . De esta manera, el tratamiento combinado inducía la misma citotoxicidad que cuando se había utilizado una dosis de luz superior (70 J/cm^2), pero la toxicidad inducida por la ZnPc disminuía, lo que volvía a destacar la eficacia del tratamiento combinado (en relación al individual).

Es importante destacar, que con ninguna de las dos matrices se detectó ninguna citotoxicidad (valores similares a los de las muestras control, no incubadas con FS ni irradiadas), cuando se irradiaron las muestras (70 J/cm^2) sin previa incubación con los FSs, ni cuando se incubaron las células con ambos FSs sin posterior irradiación (datos no mostrados).

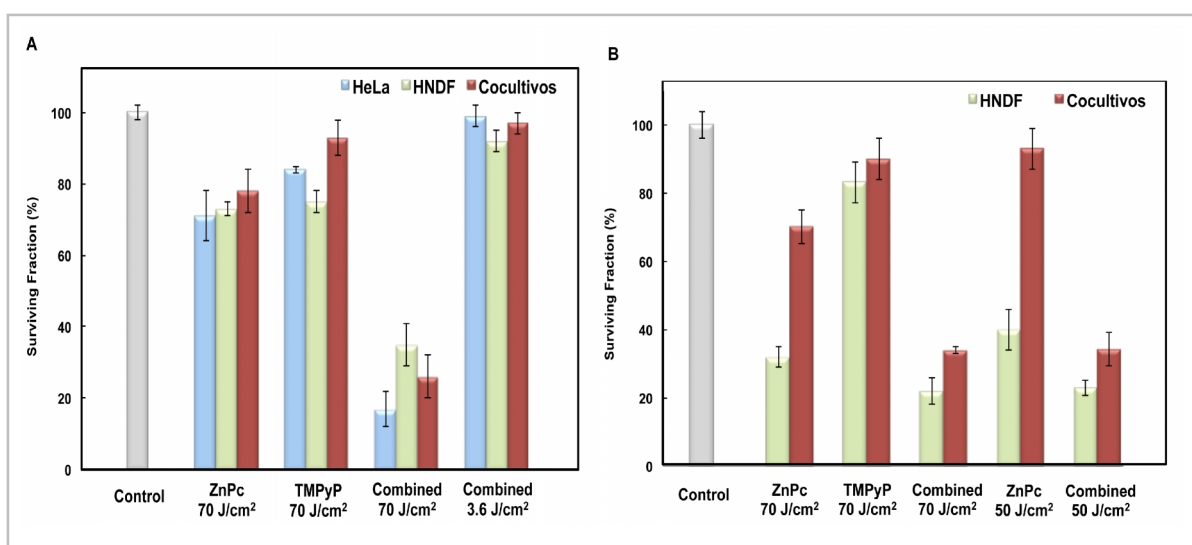


Figura 5. A: Supervivencia de células HeLa, hNDF o cocultivos en matrices de RAD16-I, sometidas a diferentes tratamientos de TFD. La viabilidad celular se evaluó 24 h después de cada tratamiento mediante el ensayo MTT. **B:** Supervivencia de células hNDF o cocultivos en matrices de colágeno, sometidas a diferentes tratamientos de TFD. La viabilidad celular se evaluó 24 h después de cada tratamiento mediante el ensayo MTT.

Además, se tomaron imágenes de las matrices 3D utilizadas con una lupa, inmediatamente antes de procesarlas para la obtención de los valores de supervivencia para el ensayo MTT. La Figura 6 muestra un ejemplo de las matrices de RAD16-I con cocultivo, y de las matrices de colágeno con hNDF y cocultivo, a las 24 h de someterlas a distintos protocolos de TFD.

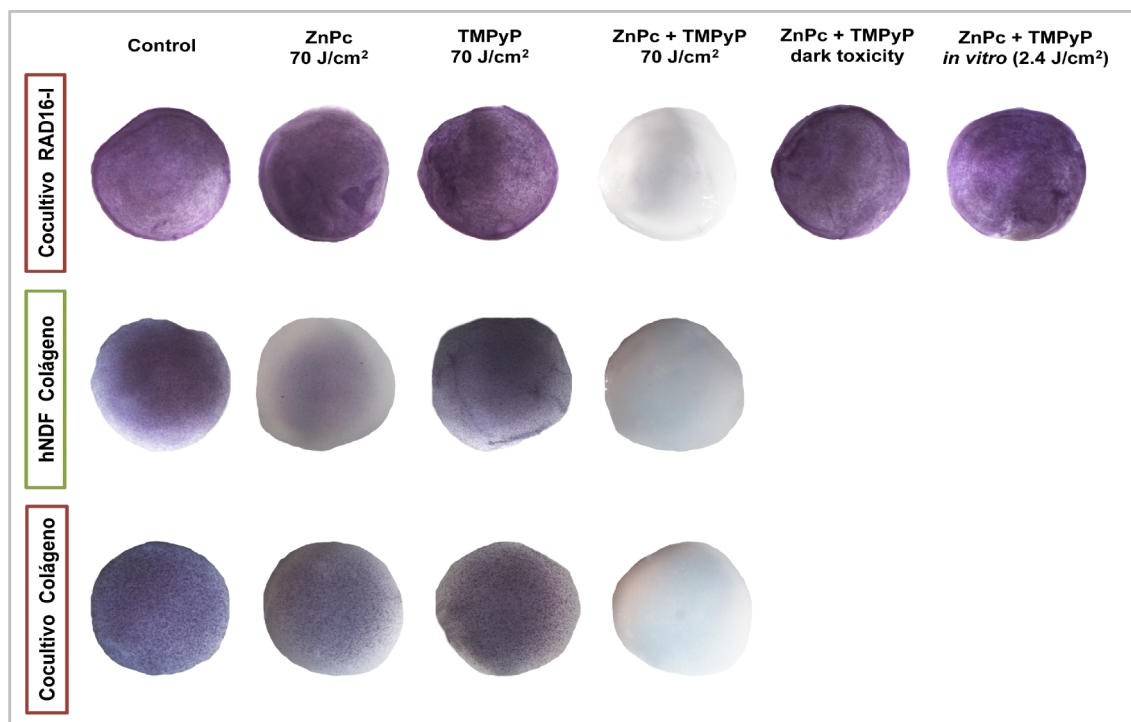


Figura 6. Imágenes de cultivos 3D de RAD16-I o de colágeno con cocultivo de células HeLa + hNDF o solo con células hNDF, 24 h después de los diferentes tratamientos de TFD. Las células viables presentan un color morado intenso debido a la formación de cristales de formazán utilizado en el ensayo del MTT.

Como se ha comentado anteriormente, la viabilidad celular también se evaluó mediante **citometría de flujo**. En este sentido, se quiso comparar cual era la técnica más representativa y fiable para analizar los efectos citotóxicos de los diversos tratamientos de TFD empleados, sobre la supervivencia celular, o si los resultados obtenidos eran similares y reproducibles usando dos técnicas diferentes. Según los resultados mostrados en la Figura 7, los % de supervivencia celular fueron muy similares a los evaluados mediante el ensayo del MTT. Algunas pequeñas diferencias en el % de supervivencia entre los mismos grupos experimentales analizados mediante MTT o mediante citometría de flujo, pueden ser atribuidas al complejo protocolo de procesamiento de las numerosas muestras y a la propia variabilidad intrínseca de cada ensayo experimental.

Las posibles diferencias significativas entre los mismos grupos experimentales atribuidas al tipo de matriz utilizado (RAD16-I o colágeno), se analizaron mediante la prueba t-Student.

Las principales diferencias se sólo se encontraron en los % de supervivencia celular de todas las líneas celulares analizadas, de las matrices incubadas únicamente con ZnPc (0.9 μ M) durante 3 h e irradiadas con 70 J/cm². En este caso si parece que el tipo de matriz proteica empleado afecta al resultado experimental obtenido.

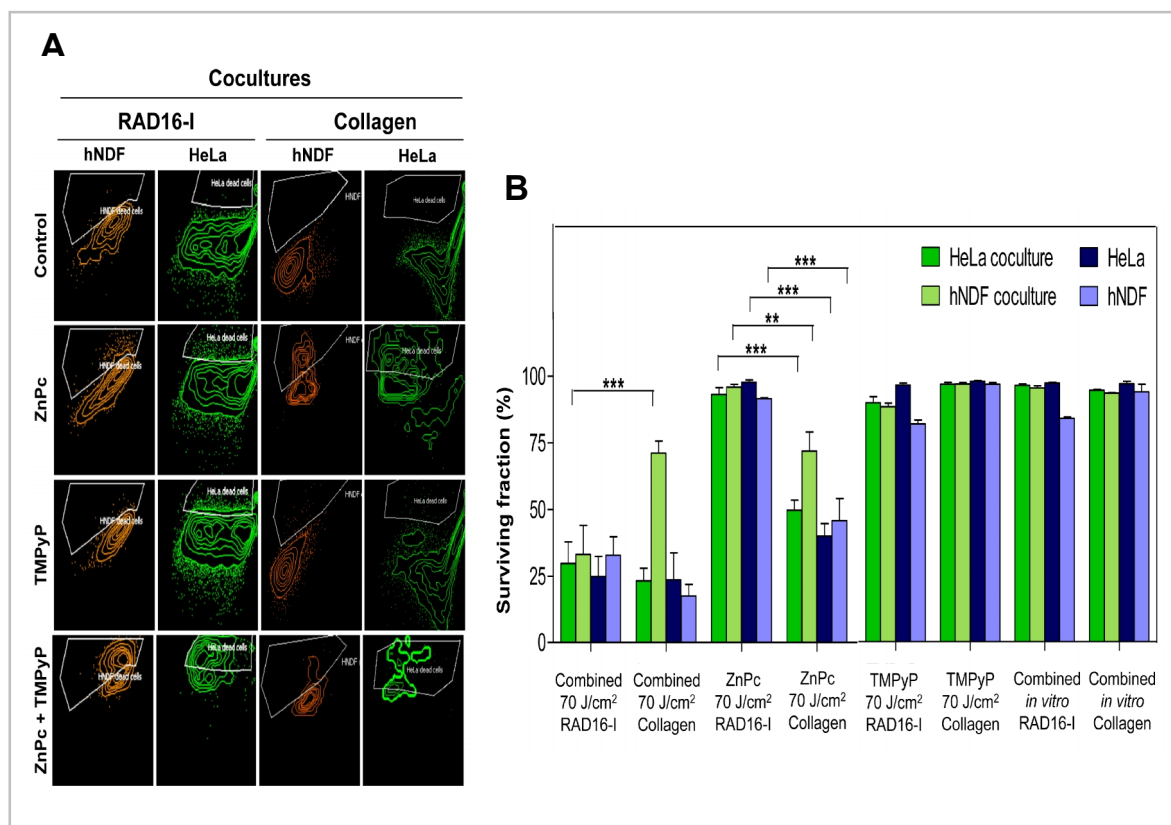


Figura 7. A: Diagramas de citometría de flujo del análisis de la viabilidad celular realizado a las 24 h después de los correspondientes tratamientos de TFD, en cocultivos de RAD16-I y de colágeno, utilizando la sonda SYTOX® blue. **B:** Gráfico de los % de supervivencia celular obtenidos mediante el análisis por citometría de flujo, a las 24 h después de los correspondientes tratamientos fotodinámicos.

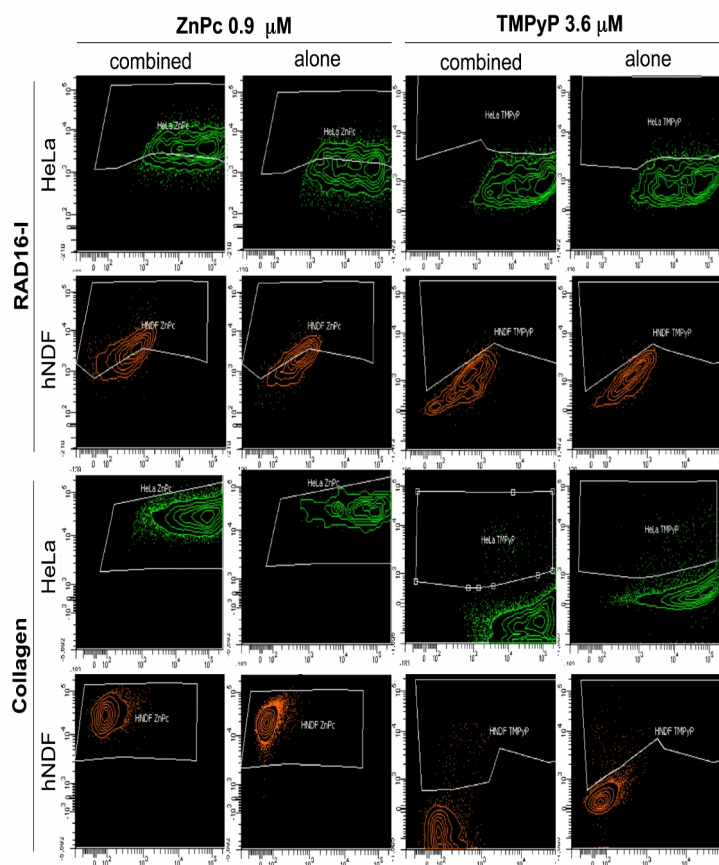
Asimismo, también analizamos por citometría de flujo las posibles diferencias en el grado de internalización (uptake) de los dos FS utilizados, en función del tipo de matriz 3D o de la línea celular empleados (ver Fig. 8). Para ello, se incubaron matrices de cocultivos de RAD16-I y de colágeno durante 3 h (en la oscuridad) con ZnPc (0.9 μ M), TMPyP (3.6 μ M) o con ambos FS a la vez. No se utilizaron las condiciones denominadas *in vitro*, ya que al emplearse concentraciones de FS muy bajas y un tiempo de incubación muy corto, no se pudo detectar la emisión de fluorescencia por citometría de flujo.

En los resultados obtenidos se observaron diferencias significativas (mediante la prueba t-Student) en el caso de la ZnPc incubada en las matrices de RAD16-I. Ambas líneas celulares (HeLa y hNDF) mostraron la misma intensidad de fluorescencia cuando la ZnPc se administró en combinación con el TMPyP, aunque la acumulación fue menor cuando se administró el FS de manera individual.

Este hecho no se observó en las matrices de colágeno, donde ambas líneas celulares presentaron la misma cantidad de ZnPc acumulada, tanto cuando el FS se administraba de manera individual como combinado. Asimismo, se observó una mayor entrada de ZnPc en el caso de las muestras de colágeno que en las de RAD16-I, lo que podría explicar la mayor citotoxicidad observada en las pruebas de viabilidad realizadas mediante el ensayo del MTT o la citometría de flujo. En el caso del TMPyP se observó que la internalización era mucho menor que en el caso de la ZnPc.

El efecto sinérgico observado cuando se utiliza el tratamiento combinado, podría deberse a que el TMPyP a las 3 h de incubación, no se encuentra totalmente internalizado en las células y podría ejercer un efecto citotóxico de forma extracelular, potenciando el efecto producido por la ZnPc.

A



B

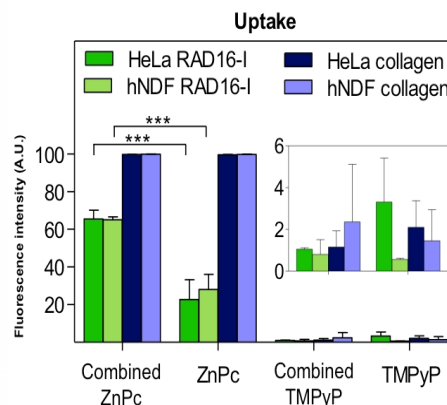


Figura 8. A: Diagramas de citometría de flujo del análisis del grado de acumulación de ZnPc y TMPyP, en cocultivos de células HeLa y hNDF desarrollados en matrices 3D de RAD16-I y colágeno. **B:** Valores de acumulación (en unidades arbitrarias) de los FSs obtenidos mediante citometría de flujo.

Finalmente, en la Figura 9A se muestran los resultados obtenidos en el SEM de las muestras de cocultivos de RAD16-I y de colágeno, y en la Figura 9B en TEM, únicamente se presentan imágenes de cocultivos de RAD16-I, ya que son experimentos que se están finalizando durante la redacción de la presente Tesis Doctoral, pero que nos han permitido confirmar las notables diferencias en la estructura de ambas matrices peptídicas y las alteraciones morfológicas que induce el tratamiento combinado ($0.9 \mu\text{M}$ de ZnPc + $3.6 \mu\text{M}$ de TMPyP + 70 J/cm^2), a las 24 h de la finalización de los diferentes tratamientos fotodinámicos.

Como se puede observar en la Figura 9A, en los cocultivos sobre la matriz de colágeno, las células HeLa presentan una morfología totalmente alterada, después de recibir el tratamiento fotodinámico con ZnPc y TMPyP. Sin embargo, los fibroblastos no tumorales mantenían una morfología similar a las células controles.

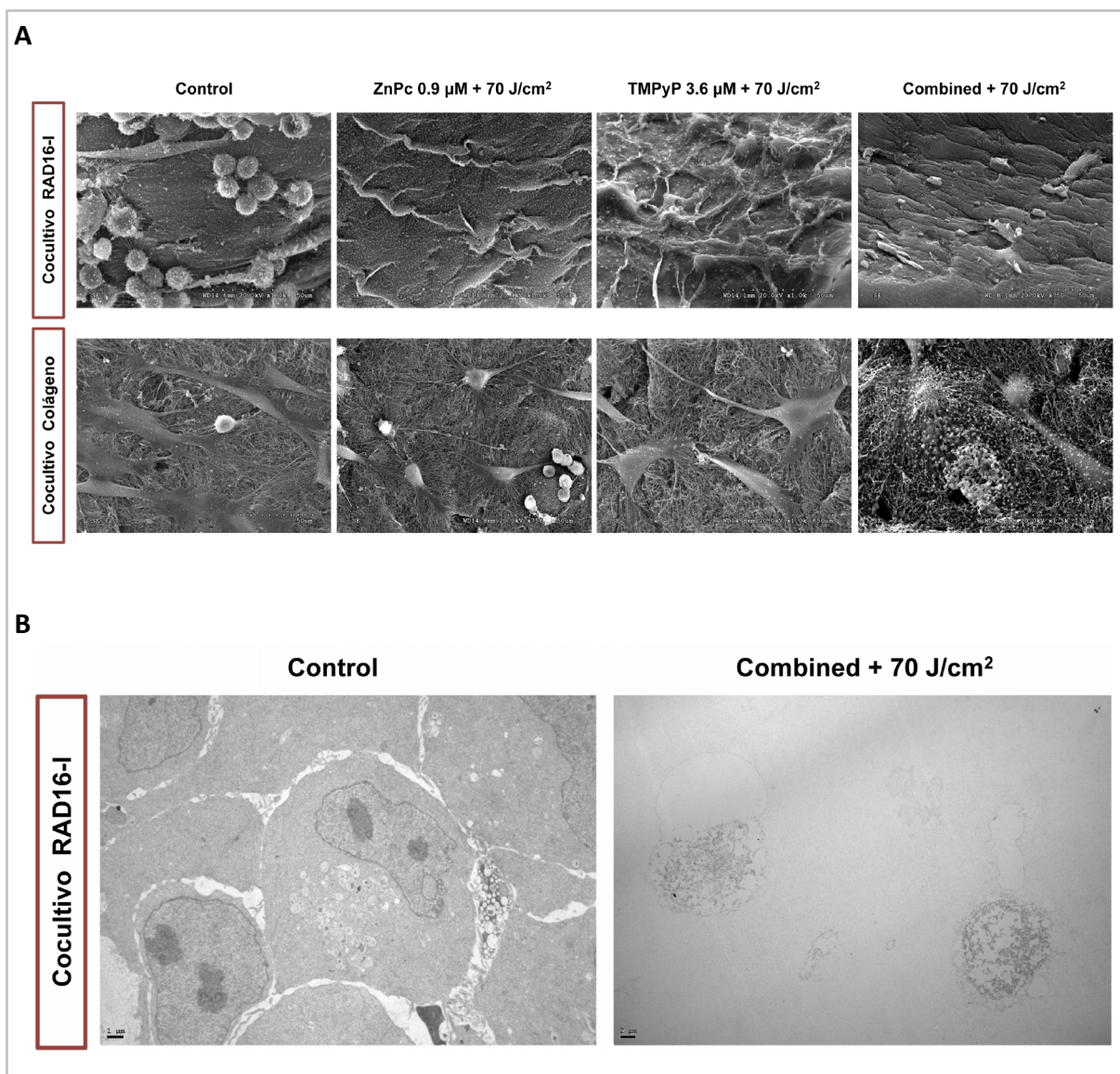


Figura 9. **A:** Cambios morfológicos inducidos en los cocultivos de RAD16-I y de colágeno, 24 h después de los distintos tratamientos fotodinámicos, visualizados al microscopio electrónico de barrido (SEM). **B:** Cambios morfológicos inducidos en los cocultivos de RAD16-I 24 h después del tratamiento combinado con respecto a los cocultivos control (no tratados), visualizados al microscopio electrónico de transmisión (TEM).

DISCUSIÓN

“El ignorante afirma, el sabio duda y reflexiona”

Aristóteles (384 AC-322 AC)



In the first study we analyze the photobiological properties of 2,7,12-tris(4-pyridinio-p-tolyl)-17-(p-(methoxymethyl)phenyl) porphycene (Py₃MeO-TBPO) in HeLa cells, in order to assess its potential as a new photosensitizer for PDT of cultured tumor cells. Flow cytometry studies demonstrated an increase of intracellular drug levels related to the incubation time, reaching a maximum at 18 h. LTG and MTG probes were used to identify the subcellular localization. Upon exposure to ultraviolet excitation, red porphycene fluorescence was detected as red granules in the cytoplasm that colocalized with LTG. No significant toxic effects were detected for Py₃MeO-TBPO in the dark at concentrations below 1 μ M. In contrast, Py₃MeO-TBPO combined with red-light irradiation induced concentration and fluence dependent HeLa cells inactivation. Besides, all photodynamic protocols assayed induced a clear effect of cell detachment inhibition after trypsin treatment. Both apoptotic and necrotic cell death mechanisms can occur in HeLa cells depending on the experimental protocol. After 18 h incubation with 0.5 μ M Py₃MeO-TBPO and subsequent red light irradiation, a high number of cells die by apoptosis, as evaluated by morphological alterations, immunofluorescent relocation of Bax from cytosol to mitochondria, and TUNEL assay. Likewise, immunofluorescence techniques showed that cytochrome c is released from mitochondria into cytosol in cells undergoing apoptosis, which occurs immediately after relocation of Bax in mitochondria. Different changes in distribution and organization of cytoskeletal elements (microtubules and actin microfilaments) as well as the protein vinculin, after apoptotic and necrotic photodynamic treatments have been analyzed. Neither of these two cell death mechanisms (apoptosis or necrosis) induced cell detachment. In summary, Py₃MeO-TBPO appears to meet the requirements for further scrutiny as a very good photosensitizer for PDT: it is water soluble, has a high absorption in the red spectral region (where light penetration in tissue is higher), and is able to induce effective high apoptotic rate (70%) related to the more widely studied photosensitizers.

Therefore, we decided to analyze the effectiveness of mesoporous silica nanoparticles (MSNPs) as a drug delivery system for the cationic porphyrin TMPyP. Silica is a very attractive material in Photomedicine, because of its excellent properties. We detected ¹O₂ production and diffusion. The surface of MSNPs has negative z potential in aqueous media (-22 \pm 4 mV). Through the analysis performed by SEM, we noted the size uniformity and spherical geometry of the synthesized MSNPs. In the case of the fluorescence emission was detected that in both cases (adsorbed TMPyP and TMPyP in ethanol), the porphyrin was not in an aggregated state, a basic fact for allowing FS internalization into cells. Furthermore, it was important to detect ¹O₂ production by the MSNPs loaded with TMPyP, a key for the induction of cell death by the mechanism type II of PDT. The possible release of TMPyP was studied, since the FS was attached to the MSNPs and non-covalently adsorbed. This fact makes it necessary to study how the TMPyP is released to see if this system can really become feasible for treatment. It is necessary to note that, if the release occurs at too high or too short time quantities, may not be interesting to use a system of this type, due to lack of control. The results of this study showed that TMPyP encapsulated in MSNPs was much more effective for PDT treatments than when administered freely, and we detected a much higher phototoxic effects. Furthermore, the results of the viability tests and morphological analysis evidenced that encapsulated TMPyP increased cell death rates, requiring lower concentrations than treatment with free TMPyP. This increased efficacy of PDT using FSs conjugated with MSNPs being very currently under study, and our results can be related to multiple studies in which it has been proved the improvement of PDT in different cell lines using this material.

Although the results presented here represent only the beginning of a new line of research, they suggest that MSNPs may be optimal as FSs transport vehicles, and the therapeutic effect may be achieved with lower doses, minimizing possible side effects. Current trends of numerous research groups in PDT, including ours, focus on the further functionalization of the surface of the NPs, with ligands that exhibit high affinity for various types of molecules overexpressed in cancer cells, a key mechanism for improving the selectivity and antitumor efficacy of any treatment.

In a previous study, we have proposed a new strategy to improve the efficiency of PDT by combined application of two PSs, ZnPc and TMPyP. The results reported here were obtained after analyzing in depth the synergistic effect of ZnPc + TMPyP to kill cancer cells in culture (2D and 3D). There are few in vitro PDT studies on the action mechanisms induced after simultaneous administration of two PSs, leading to a significantly higher phototoxicity of neoplastic cells. Summarizing our data, the major finding of this study revealed efficacy of combined administration of two PSs (ZnPc and TMPyP) to induce synergistic tumor cells photoinactivation with minimal PDT doses by apoptosis or necrosis and inhibition of cell migration. It appears that combinations of effective PSs that act by different mechanisms, could be used to increase the minimally invasive PDT-response and, therefore, should be considered the future of PDT.

Finally, we could say that 3D models have the potential to become a fundamental research tool in PDT drug screening assays. Certainly, a big challenge in biophotonics will be the optimization and exploitation of this third dimension. These models are attractive platforms to (i) better predict the outcome of PDT; (ii) carefully study the molecular mechanisms underlying PDT and (iii) develop new drugs candidates capable of breaking the protective microenvironment triggered by drug and oxygen mass transport limitations. To fulfill all these needs, 3D models should have some essential properties. Basically, they should be customtailor depending on the tumor to be modeled and easy to apply and reproducible to enable high-throughput screening applications

En esta Tesis Doctoral se han presentado resultados de variada procedencia y con contenidos diversos, pero interrelacionados entre sí. Por lo tanto, en este apartado se analizará de forma pormenorizada su relevancia en el contexto de las investigaciones correspondientes.

1. El porfíceno $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$: un buen agente para TFD

Como ya se ha comentado en la Introducción, los numerosos inconvenientes que presentan la mayoría de los FSs que actualmente están aprobados para su uso clínico han llevado a la búsqueda y caracterización de nuevos FSs más eficaces, con propiedades físicas, químicas y biológicas mejoradas. Un reto importante en TFD ha sido el desarrollo de los denominados “FSs de segunda generación”, cuyo fin es mejorar la eficacia de esta terapia y su selectividad. La caracterización de nuevos FSs es, por lo tanto, uno de los objetivos fundamentales de la TFD en la actualidad.

En los últimos años se está llevando a cabo el desarrollo de derivados del porfíceno como FSs de segunda y tercera generación, debido a sus interesantes propiedades fotofísicas y fotodinámicas.²⁰⁶ En el presente trabajo se ha caracterizado el efecto fotobiológico de un nuevo FS: el porfíceno catiónico ($\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$).²⁰⁰ La investigación llevada a cabo ha demostrado cómo diferentes tratamientos fotodinámicos con el $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ afectan a la viabilidad de células HeLa en cultivo.

Las células HeLa se consideran uno de los modelos de líneas celulares establecidas más conocido y utilizado en la investigación científica. Dichas células carecen de la proteína p53 funcional, debido a la inserción en su genoma del virus del papiloma humano 18 (HPV-18), cuya proteína E6 degrada a la proteína p53. Es bien conocido que más de la mitad de los cánceres humanos presentan mutaciones en el gen *p53*, por lo que dichas células neoplásicas tienden a evadir la apoptosis que induce un tratamiento antitumoral, adquiriendo una resistencia a la terapia que conlleva un peor pronóstico.²⁰⁷ En este sentido, la línea celular HeLa se ha usado ampliamente para entender los mecanismos de señalización implicados en la TFD a nivel molecular.^{208–210,214}

Los primeros ensayos realizados con el porfíceno demostraron la eficiente entrada de este FS en las células HeLa, en función del tiempo de incubación. Los resultados en microscopía de fluorescencia, utilizando los conocidos marcadores específicos de orgánulos LTG y MTG, revelaron que el $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ se acumula en los lisosomas de las células HeLa, y no en las mitocondrias. En este sentido, es conocido que la localización subcelular de los derivados del porfíceno es heterogénea (lisosomas, mitocondrias, RE, aparato de Golgi, entre otros), como se refleja en la revisión de Stockert et al.²⁰⁶

El $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$ no indujo toxicidad en la oscuridad (*dark toxicity*) en el rango de concentraciones utilizado en estudios fotodinámicos. Sin embargo, la supervivencia celular después de la incubación con $\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$, seguida de irradiación con luz roja, estaba relacionada tanto con la concentración de FS usada, como con la dosis total de luz recibida por las células.

Se han llevado a cabo numerosos estudios *in vitro* para evaluar la eficacia de nuevos FSs. Sin embargo, el uso de protocolos de TFD muy diferentes (línea celular, concentraciones, tiempos de incubación, fuentes de luz, etc.) dificulta la comparación de la eficiencia relativa de estos nuevos fármacos. No obstante, en la investigación llevada a cabo por el grupo de Berlanda et al. con seis de los FSs más utilizados (temoporfin, hipericina, porfímero de sodio o Photofrin®, AlPcS4 y PpIX) en la línea celular humana de carcinoma epidérmico (A431), proporciona una valiosa referencia para un análisis comparativo de nuestros resultados, aunque la línea celular sea distinta.²¹¹ En este sentido, las

condiciones experimentales del presente trabajo son bastante similares a las de los 6 FSs mencionados anteriormente. Esto incluye el tiempo de incubación con el FS (18 vs 20 h), la dosis de luz (1.2-3.6 vs 1.5 J/cm²) y el intervalo de tiempo transcurrido después de finalizar el tratamiento en el que se efectúa el ensayo del MTT (24 h después de la irradiación, en ambos casos).

En comparación con otros porfíricos estudiados previamente por nuestro grupo de investigación, el Py₃MeO-TBPO resultó más eficaz, ya que se alcanza una dosis letal (*lethal dose*, LD) > 90% con una concentración que es un orden de magnitud inferior a las empleadas para el 2,7,12,17-tetrafenilporfírico o el temoceno (un porfírico análogo de la temoporfina).^{212,213}

Por otra parte, los tratamientos fotodinámicos con Py₃MeO-TBPO indujeron una alta resistencia a la tripsinización en las células HeLa. Este efecto, poco frecuente, también ha sido descrito por el grupo de Ball *et al.*,²¹⁵ que observó un aumento de la resistencia de las células al tratamiento con tripsina, utilizando piridinio zinc(II) ftalocianina y temoporfina. Asimismo, se ha señalado que el tratamiento fotodinámico con ALA induce la inhibición del efecto de la tripsina en células tumorales humanas, debido a la reorganización del citoesqueleto.²¹⁶⁻²¹⁷ Recientemente, una disminución del despegamiento de las células al sustrato se ha correlacionado con un incremento del calcio libre intracelular, para dosis subletales de TFD con el porfímero de sodio.²¹⁸

La TFD puede inducir la muerte de células en cultivo por varios mecanismos, incluyendo la apoptosis, la necrosis, la catástrofe mitótica y la autofagia.^{39,66,97,102,108} Con las condiciones de tratamiento óptimas, descritas en el apartado de resultados, que conducen a una inactivación celular de > 90% de las células HeLa, el Py₃MeO-TBPO indujo muerte celular masiva por apoptosis, identificada mediante conocidos criterios morfológicos.⁶² Cuando se incrementó la concentración a 0.75 µM, manteniendo constantes todas las demás condiciones del protocolo, la muerte celular inducida era mayoritariamente necrótica, lo que implicaba una pérdida de la integridad de la membrana plasmática, con la consecuente liberación de los componentes citoplasmáticos y la condensación de la cromatina.⁶² Por otra parte, el ensayo del azul tripán *in situ*, confirmó estos hechos.

Para otros FSs de localización lisosomal se ha descrito un cambio similar de muerte apoptótica a muerte celular necrótica cuando la dosis de TFD es suficiente para inducir una permeabilización de la membrana lisosomal.^{219,220} Basándonos en los primeros resultados morfológicos, pudimos confirmar que, dependiendo de la concentración del porfírico catiónico utilizada (0.5 o 0.75 µM) y empleando la misma dosis de luz (3.6 J/cm²), se desencadenan dos mecanismos de muerte celular distintos: apoptosis o necrosis.

En este sentido, es bien conocido que elevadas dosis de TFD (ya sea por una alta concentración de FS, por una elevada dosis de luz o por ambas) tienden a causar muerte celular por necrosis, mientras que la TFD, administrada en dosis más bajas, tiende a predisponer a las células hacia una muerte apoptótica.⁶⁶

Además, diversas investigaciones, incluyendo algunas publicaciones de nuestro grupo, indican que la apoptosis inducida por tratamientos fotodinámicos u otros tratamientos, está asociada generalmente con la pérdida de la adhesión celular al sustrato. Por el contrario, en la muerte celular necrótica esto no sucede.⁶²

La proteína Bax, es un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2, que se oligomeriza y se trasloca desde el citosol a las mitocondrias durante la fotosensibilización, y se ha propuesto que este proceso es

un evento necesario y suficiente para inducir la apoptosis, provocando la liberación de citocromo c y otras moléculas al citosol, con la correspondiente activación de las caspasas en la apoptosis por vía mitocondrial.^{39,221,222} En relación con este hecho, nuestros resultados mostraron claramente la característica red mitocondrial de las células viables, que se convierte en pequeños y puntiformes fragmentos durante la apoptosis.^{223,224} Como se muestra en los resultados, el número de células con características apoptóticas aumentaba después de la irradiación en el tratamiento con 0.5 μ M, y alcanzaba un máximo a las 24 h. También hemos demostrado que el porcentaje de células Bax positivas (relocalizado a las mitocondrias) fue mayor que el porcentaje de células con la cromatina fragmentada (a todos los intervalos de tiempo analizados), por lo que demostramos que la relocalización de Bax, es un evento que precede a la fragmentación de la cromatina. Asimismo, pudimos confirmar que la apoptosis se disparaba por la vía intrínseca.

Los resultados obtenidos con el ensayo de TUNEL fueron consistentes con los observados para las células HeLa con marcaje Bax positivo, y corroboraron la inducción de la muerte celular apoptótica. Además, la liberación de citocromo c desde las mitocondrias al citosol no fue detectable inmediatamente después de la irradiación. Sin embargo, 3 h más tarde, las mitocondrias filamentosas mostraron un aumento de volumen y pasaron a tener una morfología esférica, como se ha descrito anteriormente en la apoptosis inducida tanto por tratamientos de TFD como de distinta naturaleza.^{223,224} Seis horas más tarde, la mayoría de las células mostraron que el citocromo c se liberaba de las mitocondrias.

Como se ha mencionado anteriormente, la investigación llevada a cabo por el grupo de Berlanda *et al.*²¹¹ resulta muy apropiada para valorar los resultados obtenidos. En este sentido, es importante señalar que las concentraciones necesarias para desencadenar la apoptosis con nuestro tratamiento son un poco más altas que las de la temoporfina (Foscan® y Fospeg®), pero son claramente inferiores a las de la hipericina, ALA/PpIX y porfímero de sodio.

Por otra parte, la identificación de las vías de señalización de la apoptosis que se desencadenan por los FSs acumulados en distintos orgánulos, es un tema de intensa investigación y un gran interés en TFD.^{97,214} Las estructuras celulares que contengan altas concentraciones de FS serán las que resulten preferentemente dañadas después de la irradiación, debido a la alta concentración local de ROS formadas.²²⁵ Varios factores determinan el patrón de localización subcelular de los distintos FSs, incluyendo sus propiedades físicas y químicas (lipofilia y carga) así como el vehículo de entrega.⁹⁷ Los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia demostraron que este nuevo porfímero catiónico se acumulaba en los lisosomas de las células HeLa, y por lo tanto, después de la irradiación, estos orgánulos resultarán dañados.

En TFD la apoptosis estuvo inicialmente vinculada exclusivamente a aquellos FSs que se acumulaban en las mitocondrias.²²⁶ Sin embargo, en la última década se ha comprobado que un daño a los lisosomas, también puede desencadenar la apoptosis.^{44,87,88,112,227} Por otro lado, estudios llevados a cabo con dos ftalocianinas con diferente localización subcelular, como la ftalocianina de silicio 4 (Pc 4) que se localiza en las mitocondrias y en las membranas del RE, y su derivado Pc 181 que se acumula en los lisosomas, han mostrado, inesperadamente, que Pc 181 es más eficaz para inactivar células en cultivo que la Pc 4 de localización mitocondrial, e induce apoptosis, aunque el proceso es más lento.²²⁸ En este sentido, nuestros resultados son similares a los descritos utilizando Pc 181, ya que el Py₃MeO-

TBPo muestra también una localización lisosomal y es capaz de generar una respuesta apoptótica lenta pero eficaz, 24 h después de la irradiación. Del mismo modo, los estudios de TFD con Pc 4 y Pc 181 han demostrado un aumento de la eficiencia de los FSs de localización mitocondrial, cuando se combinan con fármacos que alteran la función de los lisosomas, lo cual muestra su acción adyuvante.²²⁷

Alternativamente, un nuevo camino para conseguir efectos sinérgicos de inactivación celular se basa en combinar el uso de dos FSs con diferente localización subcelular, tales como la porfirina catiónica (TMPyP) localizada en los lisosomas, y la Zn(II)-ftalocianina (ZnPc), situada en el aparato de Golgi, como se ha estudiado en profundidad en la presente Tesis Doctoral.^{113,116} Esta estrategia debe garantizar la inactivación de las células tumorales y vencer la posible generación de resistencia a TFD, como se comentará más adelante en esta discusión.^{118,1229}

Sin embargo, el mecanismo preciso de transducción de señales celulares en la apoptosis inducida por FSs de localización lisosomal todavía no está totalmente dilucidado. Recientemente, el grupo de Liu *et al.* ha demostrado que Bax es un componente esencial de la vía apoptótica mitocondrial inducida por el fotodaño a los lisosomas, desencadenado por la clorina NPe6 (mono-L-aspartyl chlorin e6).²³⁰ En este sentido, nuestro valor para la relocalización de Bax del citosol a las mitocondrias es ligeramente superior al obtenido por estos autores (70% vs 62%, respectivamente).

Además, es muy importante mencionar que la eficacia de inducción de apoptosis mostrada por el Py₃MeO-TBPo (~ 70%) supera la de algunos de los FSs más utilizados, como por ejemplo, la de la Pc 4, o la de otros FSs similares con localización lisosomal.^{226, 227,228,230}

Todos los aspectos relacionados con el proceso de apoptosis desencadenado por los FSs de localización lisosomal (como el porfíriceno catiónico), así como, los resultados relacionados con las alteraciones del citoesqueleto, se han comentado más profundamente en el apartado 3 de la Discusión, y por lo tanto no se han desarrollado aquí para evitar repeticiones innecesarias.

Con respecto al análisis de las posibles alteraciones inducidas sobre el citoesqueleto, hay que tener en cuenta que los MTs se caracterizan por una inestabilidad dinámica (acortamiento-alargamiento), que controla la disposición de los orgánulos en la célula, el tráfico intracelular de vesículas, orgánulos y proteínas y la segregación de los cromosomas durante la mitosis.²³¹ Por ello, también son dianas celulares de muchos tratamientos contra el cáncer.²³²

Por otro lado, los MFs de actina-F están involucrados en una amplia variedad de funciones celulares, como el control de la morfología celular, el transporte de vesículas y orgánulos, el posicionamiento de los componentes de la célula, la citocinesis, la locomoción, la adhesión célula-célula, la interacción célula-sustrato y la transducción de señales.²³²

Anteriormente, varios grupos de investigación, incluyendo el nuestro, han demostrado que los diferentes componentes del citoesqueleto pueden resultar dañados por los tratamientos fotodinámicos con diferentes FSs.^{42,49,234} El análisis de los MTs y de los MFs de actina, después del tratamiento apoptótico de TFD con Py₃MeO-TBPo, mostró que las células sufrían alteraciones progresivas en la organización y distribución de estos dos componentes del citoesqueleto. Después del tratamiento apoptótico, el inmunomarcaje de α -tubulina se redujo a pequeñas áreas esféricas situadas entre los núcleos fragmentados. Además, nuestros resultados muestran que la mayoría de los MTs sufren una desorganización masiva como resultado del tratamiento fotodinámico necrótico.

Por otra parte, las imágenes de inmunofluorescencia mostraron que el marcaje celular de la proteína de adhesión vinculina disminuía de manera gradual e irreversible después del tratamiento apoptótico, de forma concomitante con un aumento en la fluorescencia del citosol de las células con la cromatina apoptótica. Estos cambios se asociaron con una desorganización de las fibras de estrés en los mismos intervalos de tiempo. Sin embargo, 24 h después de la irradiación, el marcaje para vinculina se detectó como pequeñas señales fluorescentes entre los restos celulares.

Es bien conocido que los complejos de adhesiones focales son regiones especializadas de la membrana plasmática que participan en la unión a la matriz extracelular, donde las fibras de estrés de actina y las proteínas estructurales asociadas a la actina, tales como la vinculina, están conectadas.²³⁵ Por otra parte, una interrupción en la asociación de las células al sustrato es capaz de inducir la apoptosis en células dependientes de anclaje, tales como las células endoteliales.²³⁶

Por el contrario, el tratamiento fotodinámico necrótico indujo un daño celular rápido que impidió el desensamblaje de la vinculina de la membrana plasmática, y esta proteína muestra una distribución similar a la de las células control (no tratadas). Sin embargo, como en el caso de los MTs, los cambios inducidos por el tratamiento necrótico fueron mucho más drásticos y dieron lugar a importantes modificaciones irreversibles en el patrón de disposición de los MFs de actina. Del mismo modo, también ha sido descrito que la despolimerización de la actina-F ocurre en diferentes tipos de células en las que se desencadena la apoptosis, en respuesta a diversos estímulos. Una reorganización de los microfilamentos periféricos tiene lugar de forma simultánea al redondeamiento celular, y precede a la pérdida de adhesión cuando se desencadena la apoptosis.²³⁷

Para comprender plenamente el significado del hecho que la TFD asociada con Py₃MeO-TBPO puede inducir un daño directo a la actina-F y/o a diversas proteínas de adhesión, se requiere una investigación más profunda, pero los resultados presentados aquí podrían llegar a ser atractivos en el desarrollo de mejores FSs de segunda generación. Además, el tratamiento apoptótico con el porficeno inhibía la migración de células HeLa a las 48 h después del tratamiento, como se observó en el ensayo de curación de heridas realizado. Este resultado indica que las células no son capaces de reparar el daño inducido después de dicho tratamiento. En este sentido, se ha descrito que células de un carcinoma de células escamosas (SCC-13), que eran resistentes a la TFD con Me-ALA, mostraban una mayor capacidad de cerrar heridas, así como un mayor número de fibras de estrés y una mayor expresión de proteínas implicadas en la adhesión célula-sustrato.¹¹⁸

En resumen, el derivado catiónico del porficeno Py₃MeO-TBPO parece cumplir muchas de las características requeridas para ser considerado un buen FS en TFD ya que: es soluble en agua, tiene una alta absorción en la región roja del espectro (donde la penetración de la luz en el tejido es mayor), induce eficazmente la formación de ¹O₂ en las células, y es capaz de inactivar células HeLa induciendo una elevada tasa de apoptosis (~ 70%) en relación con los FSs más estudiados, y sin perder la adhesión al sustrato. Por todo ello, queda justificado el continuar realizando un análisis más detallado de este FS, y en un futuro se llevarán a cabo estudios *in vivo* para evaluar su potencial terapéutico en TFD.

2. Las MSNPs como vehículos idóneos para la incorporación de FSs

En el momento en que una molécula que presenta actividad, del tipo que sea, entra en contacto con un sistema *in vitro* o *in vivo*, es imprescindible conocer cómo se distribuye esta molécula a través del sistema para poder entender cómo y dónde desarrolla su función. El transporte (*drug delivery*) es la distribución de fármacos, entendidos como moléculas con actividad biológica, a través de un organismo. En muchos casos, los fármacos no se pueden suministrar directamente, ya sea porque no son estables y se degradan, o bien porque resultan tóxicos. Por ello, es necesario introducir vehículos/transportadores, que actúen de soporte para el fármaco en cuestión. De este modo, éste quedará aislado del medio, evitando su degradación y una posible toxicidad.

Como ya se ha mencionado en la introducción, actualmente se conocen muchos tipos de vehículos para el transporte de fármacos. Entre otros: liposomas, NPs de diferentes tipos (metálicas, poliméricas, inorgánicas...), micelas y proteínas.^{177,183,238} Los estudios relacionados con la síntesis y la administración de nuevos FSs resultan por lo tanto fundamentales para el desarrollo de la TFD.

Por ello, nos propusimos analizar la efectividad de las nanopartículas mesoporosas de sílice (MSNPs) para vehiculizar la porfirina catiónica TMPyP. Se seleccionó este tipo de NP debido a que el sílice resulta un material muy atractivo en la fotomedicina, por las excelentes propiedades que presenta (comentadas en el apartado de la Introducción). Estas NPs se han utilizado como una alternativa muy prometedora a las NPs de sílice compactas, ya que los resultados previos obtenidos por el grupo del Dr. Nonell, utilizando éstas últimas, no fueron los deseados. La encapsulación de FSs en los poros de las MSNPs y diversos ensayos antitumorales han sido descritos previamente por otros grupos de investigación.^{43,174,183} Por otra parte, el TMPyP reunía propiedades adecuadas para utilizarlo como modelo de FS en estos primeros estudios con las MSNPs.

Como ya se ha comentado, la TFD se basa en la producción de ROS, principalmente $^1\text{O}_2$, por la interacción del estado excitado del FS con el oxígeno en estado fundamental. Por lo tanto, es crucial que las moléculas de oxígeno en estado fundamental puedan difundir a las inmediaciones del fármaco. En la misma línea lógica, no es necesario que los FSs encapsulados sean liberados, pero resulta esencial que el O_2 difunda dentro y fuera de las partículas. Cuando se utilizaron NPs compactas, se detectó producción de $^1\text{O}_2$, pero éste no podía difundir a través de las paredes del material. Por ello, se descartaron las NPs de sílice compacta como posible vehículo para la encapsulación de FSs, ya que no permitían la difusión del $^1\text{O}_2$ generado por la activación del fármaco encapsulado.

El método de encapsulación que se eligió fue la adsorción del FS sobre la superficie de las MSNPs, así como dentro de los poros de las mismas, mediante interacciones electrostáticas, ya que el TMPyP es un FS tetracatiónico, y la superficie de las MSNPs tiene un potencial z negativo en medio acuoso (-22 ± 4 mV). Mediante los análisis realizados por SEM, se pudo comprobar la uniformidad del tamaño, así como la geometría esférica de las MSNPs sintetizadas.

Del mismo modo, se evaluó por espectrofotometría y espectrofluorimetría la estabilidad de estas NPs. En el caso de la emisión de fluorescencia, se detectó que, tanto en el TMPyP adsorbido como en el TMPyP en etanol, había dos bandas bien definidas, lo que indicaba que la porfirina no se encontraba en un estado agregado, un hecho fundamental para permitir la internalización del FS dentro de las células. Asimismo, resultó importante la detección de la producción de $^1\text{O}_2$ por parte de las MSNPs cargadas con

el FS, un elemento fundamental para la inducción de la muerte celular mediante el mecanismo de TFD de tipo II.^{1,2}

Además, se estudió la posible liberación del TMPyP de las MSNPs, ya que el FS estaba unido a las NPs por adsorción y no covalentemente. Este hecho hace que sea necesario estudiar cómo se libera el TMPyP, para ver si realmente este sistema puede llegar a ser factible para un tratamiento. Es necesario tener en cuenta que, si la liberación se produce en cantidades demasiado elevadas o bien a tiempos demasiado cortos, puede no ser interesante utilizar un sistema de este tipo, debido a la falta de control. Los resultados obtenidos indicaron que la liberación fue mayor en el caso de la muestra en etanol que en el medio acuoso (PBS). Esto se explicaría por la alta hidrofobicidad de su núcleo tetrapirrólico, que haría que el compuesto fuese más soluble en etanol que en PBS. El hecho de que la liberación sea casi 2 órdenes de magnitud inferior en PBS supone una ventaja a la hora de trabajar con medios biológicos. Para las muestras en PBS la liberación de TMPyP no superó en ningún caso el 1%.

Los resultados del presente trabajo evidenciaron que el TMPyP vehiculado en MSNPs era mucho más eficaz para tratamientos de TFD en células HeLa que cuando se administra de forma libre, ya que detectamos unos efectos fototóxicos muy superiores.

En primer lugar, comprobamos que el TMPyP podía acumularse en el interior de las células HeLa, incorporado en NPs de sílice. Asimismo, se observó una mayor acumulación del FS cuando iba conjugado con las MSNPs que cuando se administraba de forma libre. Además, los resultados de los ensayos de viabilidad y los análisis morfológicos evidenciaban que el FS vehiculado en MSNPs aumentaba considerablemente las tasas de muerte celular, requiriendo concentraciones menores que los tratamientos con el TMPyP libre. Este aumento de eficacia de la TFD mediante FSs conjugados con MSNPs está siendo muy estudiado actualmente, y nuestros resultados se pueden relacionar con múltiples estudios en los que se ha podido comprobar esta mejora de la TFD en distintas líneas celulares mediante el uso de este material.^{168,238,239}

En relación con los resultados de la localización subcelular, se observó que las MSNPs-TMPyP cuando se internalizan en células HeLa, parecían acumularse en los lisosomas ya que se visualizaron gránulos de fluorescencia roja ubicados en el citoplasma, en lugares que no se correspondieron con las mitocondrias. Este hecho se pudo confirmar mediante los estudios de citometría de flujo, en los que se obtuvo una mayor intensidad de fluorescencia (~ 10 veces superior) en células incubadas con MSNPs-TMPyP. En este sentido, el grupo de Bechet *et al.*¹⁶⁸ entre otros, ha propuesto que las NPs pueden actuar como nuevos vehículos para un transporte más eficaz de los FSs. Además, la intensidad de fluorescencia obtenida se incrementaba con el aumento de concentración del FS. Sin embargo, en células incubadas con MSNPs-TMPyP 1 μ M se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia que posiblemente se debía a una agregación de las NPs, dificultándose la entrada del FS en las células. Es bien conocido que muchos FSs, así como las NPs, tienden a agregar en medios acuosos, siendo menos fotoactivos.²⁴⁰

Los ensayos de citotoxicidad (MTT o azul tripán *in situ*) han permitido comprobar, una vez más, el aumento de la eficacia del FS vehiculado en MSNPs. Los porcentajes de supervivencia celular obtenidos se reducían hasta en un 70%, en comparación con los porcentajes de viabilidad de las células tratadas con TMPyP libre (a igualdad de concentración de tratamiento y de dosis de luz).

También se han realizado ensayos de supervivencia celular en oscuridad para evaluar la posible *dark toxicity* de los tratamientos empleados, pudiendo confirmarse que tanto el FS como las MSNPs no presentaban un efecto tóxico en ausencia de irradiación de acuerdo con las características que deben poseer los FSs ideales de nuevo diseño para TFD, para ser considerados como tales.³ Este hecho es muy importante desde un punto de vista clínico. Los FSs no deben ser tóxicos *per se* antes de la correspondiente irradiación, ya que no deben dañar a las células sanas donde se puedan acumular; sólo deben inducir daños en las células tumorales que se sometan a irradiación.^{1,2,25}

Una vez confirmada la eficacia del FS y su mayor efecto fototóxico al incorporarlo en MSNPs, se realizaron distintos experimentos para poder observar los diferentes mecanismos de muerte celular inducidos por los diferentes tratamientos de TFD utilizados.

Los resultados obtenidos indicaron que el TMPyP en estado libre inducía un pequeño porcentaje de apoptosis (11%), a una concentración de 0.1 μM con una irradiación de 15 min (7.2 J/cm^2). A concentraciones menores de TMPyP, o con dosis inferiores de luz, no se produjeron daños celulares significativos. Sin embargo, usando una concentración de TMPyP de 1 μM ya se generaban altas tasas de necrosis (con 10 min de irradiación, 4.8 J/cm^2). Por el contrario, en células con el FS incorporado en MSNPs, se pudo ver que bastaba con una concentración de 0.075 μM y una irradiación de 10 min (4.8 J/cm^2) para obtener un 31% de células apoptóticas y un 7% de necrosis. Concentraciones y tiempos de irradiación superiores (sin llegar a utilizar concentraciones que produjesen la agregación de las NPs), generaron un efecto fototóxico en el cual la totalidad de las células se inactivaban por necrosis.

Finalmente, el resultado de la inmunofluorescencia indirecta para citocromo c sirvió para corroborar la existencia de una muerte por apoptosis debida al tratamiento fotodinámico. En concreto, en las células HeLa incubadas con MSNPs-TMP y sometidas a TFD se observó la liberación de citocromo c mitocondrial hacia el citosol, característica de este proceso de muerte.

Se ha descrito un cambio similar para otros FSs de localización lisosomal, de una inactivación por apoptosis a una muerte celular necrótica, cuando la dosis de la terapia fotodinámica es suficiente para causar daño en la membrana de los lisosomas.^{121,241,242} Como ya se ha mencionado en el apartado anterior de esta Discusión, la identificación de las vías de señalización de la apoptosis, que se activan por FSs acumulados en orgánulos, es un tema de intensa investigación y un gran interés en TFD.⁹⁷

Los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia muestran que en nuestras condiciones experimentales las MSNPs-TMPyP se acumulan en los lisosomas de las células HeLa, al igual que el TMPyP en su forma libre, y por lo tanto, después de la irradiación, estos orgánulos pueden resultar dañados, desencadenándose la apoptosis.^{241,242} Este hecho coincide con diversos estudios realizados acerca de las implicaciones de la TFD en el proceso de apoptosis y la liberación de citocromo c.^{243,244,245}

Aunque los resultados aquí presentados sólo representan el inicio de una nueva vía de investigación, parecen indicar que las MSNPs pueden ser vehículos óptimos para transportar FSs, ya que el efecto terapéutico podría alcanzarse con dosis más reducidas de FSs, minimizando los posibles efectos secundarios que éstos pudieran inducir.

Las tendencias actuales de numerosos grupos de investigación en TFD, incluido el nuestro, se centran en la funcionalización adicional de la superficie de las NPs, con ligandos que muestren una alta afinidad por distintos tipos de moléculas sobreexpresadas en las células cancerosas, un mecanismo fundamental para mejorar la selectividad y la eficacia de cualquier tratamiento antitumoral.

3. La combinación de dos FSs: una nueva estrategia que incrementa la eficacia de la TFD

Uno de los enfoques más innovadores del presente trabajo de investigación ha sido analizar en profundidad los efectos fotodinámicos provocados por la incubación simultánea de dos FSs, la ftalocianina de zinc(II) (ZnPc) y la porfirina catiónica *meso*-tetra(4-N-metilpiridil)porfina (TMPyP), tanto en cultivos celulares (2D y 3D) como en ensayos *in vivo*.

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de las terapias aprobadas contra el cáncer presentan numerosas deficiencias o efectos secundarios. Asimismo, aunque la TFD es una modalidad terapéutica aprobada en clínica, también presenta algunas desventajas, lo que puede dar lugar a resultados no óptimos. Debido a esto, se están desarrollando nuevas estrategias más específicas para TFD, con el objetivo de superar estos problemas e incrementar su eficacia antitumoral.^{2,131}

Esta nueva estrategia de TFD, que consiste en la combinación de dos FSs con distinta diana terapéutica, y distinto mecanismo de acción, administrados en un único régimen de tratamiento, ha dado resultados sumamente positivos ya que conlleva una fotoinactivación de las células neoplásicas, con un efecto sinérgico, empleando dosis mínimas de TFD. Sin embargo, los estudios llevados a cabo con esta nueva estrategia han muy sido escasos.^{113,116,162,163,244} Por lo tanto, los resultados presentados en esta Tesis Doctoral pueden ser calificados de totalmente novedosos, especialmente por la profundidad con los que se han llevado a cabo.

En las investigaciones relacionadas con el efecto inducido por el uso combinado de dos FSs, en casi todos estos estudios realizados se ha utilizado al precursor ALA como uno de los FSs (genera PPIX), mientras que el otro FS ha sido variable. El grupo de Peng *et al.*²⁴⁴ demostró en xenoinjertos de tumores humanos que el efecto antitumoral inducido por ALA podía incrementarse por el uso de dosis bajas de Photofrin®. En esa investigación también se demostraba un efecto fototóxico incrementado, en la línea celular de adenocarcinoma de colon humano (WiDr) cuando el ALA se aplicaba en combinación con Photofrin®, seguido de una irradiación con luz azul.

En el año 2009, el grupo de Schneider-Yin *et al.*¹⁶² demostró que la terapia combinada de ALA + hipericina (incubación de 4 h), seguida de una irradiación con luz blanca (2.5 J/cm²), aumentaba el efecto fototóxico mediado por la PPIX en células tumorales endometriales humanas (HEC-1A). La razón del efecto sinérgico observado, según los autores, podría deberse a que las células tratadas con ALA e hipericina producían más cantidad de PPIX que las células tratadas sólo con ALA. Este incremento en la fototoxicidad no se observó cuando las células se irradiaron con luz roja (2.5 J/cm²).

Más recientemente, el grupo de Besic Gyenge *et al.*¹⁶³ ha estudiado el efecto fotodinámico de la combinación de dos FSs: hipericina y Foslipos® (5 h de incubación seguida de irradiación con luz blanca), en células escamosas de carcinoma de cabeza y cuello. El tratamiento combinado fue el que indujo una mayor citotoxicidad, y se observó una inducción tanto de apoptosis como de necrosis en las muestras irradiadas.

Teniendo en cuenta los estudios comentados anteriormente, los resultados presentados en esta Tesis doctoral son muy diferentes, ya que hemos analizado los efectos de la combinación de dos FSs, y ninguno de ellos es un precursor incorporado en la vía de síntesis de un FS endógeno, como es el caso del ALA. Además, la irradiación se ha llevado a cabo utilizando luz roja, ya que es la que se utiliza más comúnmente en los estudios clínicos. Asimismo, el tiempo de incubación de las células con ambos FSs fue de tan sólo 1 h.

Por lo tanto, esta opción terapéutica ha sido extensamente estudiada en nuestro laboratorio y ha sido el tema principal de la presente Tesis Doctoral.

A continuación se comentarán los resultados más relevantes obtenidos en las líneas celulares humanas establecidas: HeLa, HaCaT y MCF-7, para posteriormente analizar los ensayos realizados *in vivo* y previamente en la línea celular murina B78H1, para concluir con los datos evaluados para los diferentes tipos de cultivos 3D.

3A. Efecto sinérgico de la combinación de ZnPc y TMPyP en cultivos celulares 2D

Para el desarrollo de nuevos fármacos en Oncología, la eficacia de un tratamiento en términos de inactivación celular es un concepto de capital importancia. El análisis de los resultados presentados a continuación evidencia el gran potencial fotoinactivador de la TFD como una prometedora terapia antitumoral.

Con respecto a la citotoxicidad, los resultados de supervivencia celular obtenidos mediante el ensayo del MTT demostraron la inducción de un efecto citotóxico sinérgico en las tres líneas celulares analizadas, cuando los FSs se administraron de forma simultánea. Los resultados observados en células HaCaT y MCF-7 fueron similares a los obtenidos previamente en un estudio muy preliminar que llevamos a cabo en células HeLa.¹¹⁶ Sin embargo, cabe resaltar que hubo una ausencia completa de toxicidad cuando no se realizó una posterior irradiación de las muestras, después de la correspondiente incubación con ambos FSs. En otras palabras, la combinación de los dos FSs no inducía toxicidad en la oscuridad.

Es importante señalar que el efecto fotodinámico sinérgico se inducía con el mismo protocolo experimental en las tres líneas celulares analizadas, lo que evidencia directamente su elevada eficacia para la fotoinactivación celular. El efecto sinérgico (inactivación celular > 94%) se logró con 1 h de incubación con 5×10^{-8} M de ZnPc y 10^{-6} M de TMPyP, seguida de una irradiación con luz roja de 2.4 J/cm^2 .

Por otra parte, hay que destacar que diversas publicaciones ponen de manifiesto que los FSs comerciales más prometedores, incluyendo los ya aceptados para ensayos clínicos, requieren generalmente condiciones experimentales más elevadas que las utilizadas en esta investigación, para la inactivación de células *in vitro*.^{211,246} La comparación de las eficiencias de fotosensibilización entre diferentes FSs resulta muy difícil, debido a la variabilidad de los protocolos experimentales utilizados, siendo esta cuestión muy criticada en numerosas publicaciones de TFD.^{246,247} En este sentido, nuestro grupo de investigación cuenta con una larga experiencia en el análisis comparativo de las eficacias de diferentes FSs (ya sean FSs comercializados o recién sintetizados). Ninguno de ellos ha requerido condiciones experimentales tan bajas para la inactivación de células tumorales en cultivo. Por ejemplo, para inducir un efecto fotodinámico letal en células HeLa, se requiere una concentración de ZnPc 100 veces superior (5×10^{-6} M) a la utilizada en el tratamiento combinado con la porfirina catiónica.²⁴⁶

También es importante destacar la ausencia total de citotoxicidad ejercida por la administración combinada de ZnPc y TMPyP, en ausencia de irradiación, en todas las líneas celulares ensayadas. La ausencia de toxicidad en la oscuridad es una propiedad que debe poseer un FS ideal para evitar efectos secundarios no deseados cuando es administrado a pacientes.³ Basándonos en los resultados positivos

obtenidos en los ensayos de citotoxicidad, los siguientes estudios se centraron en células HeLa, con el fin de caracterizar los mecanismos de muerte celular inducidos.

En relación al mecanismo de muerte desencadenado, la TFD es capaz de inducir la muerte de células en cultivo mediante distintas vías de inactivación, como ya se ha comentado anteriormente. El tipo específico de muerte celular inducido por la TFD depende de diversos parámetros, incluyendo: la naturaleza del FS utilizado, las condiciones del tratamiento (concentración, tiempo de incubación del FS y dosis de luz) y el tipo de línea celular, tal y como se recoge en las sucesivas revisiones que se han llevado a cabo acerca de este tema en los últimos años.^{37,97,108,248}

En la presente investigación, se han llevado a cabo los ensayos más admitidos hoy en día, para identificar de forma irrefutable que el tratamiento sinérgico inducía muerte celular por apoptosis o por necrosis en función de la dosis de luz, descartando otras formas de muerte descritas en TFD, concretamente la autofagia.²¹⁴ El análisis de los cambios morfológicos en microscopía óptica y electrónica constituye una herramienta muy importante para identificar el tipo específico de muerte celular.^{61,62,214} Varios estudios indican que algunas características, consideradas típicas de la apoptosis, también pueden tener lugar durante la autofagia, sobre todo cuando las células carecen de algunos moduladores esenciales de la apoptosis, como son Bax y Bak o las diferentes caspasas.⁶⁶

En nuestro trabajo, múltiples técnicas de microscopía óptica mostraron que el tratamiento de TFD con ZnPc + TMPyP inducía principalmente la muerte celular apoptótica (> 91%) o la necrótica (> 89%), en función de la dosis de luz recibida (2.4 vs 3.6 J/cm²). Numerosas investigaciones han demostrado que un cambio en la ruta de muerte celular inducida, de apoptosis a necrosis, es dependiente de una gran variedad de parámetros, incluyendo la naturaleza del FS, el genotipo celular y la dosis de TFD (concentración de FS, dosis de luz o ambos).^{2,108,121} Cada uno de estos tipos de muerte celular depende a su vez de los niveles de energía intracelular, y poseen un conjunto de características morfológicas y bioquímicas, que permiten identificar el mecanismo de muerte implicado.^{61,249,250}

Asimismo, las imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica (SEM y TEM) nos han permitido corroborar los resultados obtenidos en microscopía óptica.

El tratamiento apoptótico sinérgico indujo notables y progresivas alteraciones morfológicas en las tres líneas celulares analizadas, que se produjeron a intervalos de tiempo variables. No todas las células respondieron al mismo tiempo al tratamiento, por lo que siempre es necesario determinar el intervalo de tiempo donde la mayor cantidad de las células se ha sometido a algunas de las etapas que definen un tipo de muerte celular concreto. Sin embargo, cabe destacar que los FSs más eficaces descritos hasta ahora (como por ejemplo Pc 4), pueden inducir también respuestas apoptóticas muy eficaces, pero se requieren condiciones experimentales más drásticas que las utilizadas en el presente estudio.^{211,249}

Las investigaciones realizadas en la última década han confirmado que la TFD puede disparar las rutas de muerte celular por apoptosis, autofagia, catástrofe mitótica y necrosis.^{39,66,97,102,108} Por este motivo, hemos realizado varios ensayos bioquímicos para dilucidar el mecanismo molecular que estaba detrás de la inducción de la apoptosis como la principal vía de muerte celular inducida en las células HeLa por el tratamiento combinado seguido de irradiación (2.4 J/cm²).

Los resultados obtenidos por citometría de flujo mostraron una pérdida relativamente rápida y progresiva del $\Delta\Psi_m$ después del tratamiento. Estos datos concordaban con los resultados obtenidos previamente mediante los ensayos morfológicos. Además, la masiva respuesta apoptótica inducida por

el tratamiento combinado fue confirmada por las pruebas de anexina-V/IP, el ensayo TUNEL y la fragmentación de PARP. El ensayo TUNEL demostró que la morfología de la cromatina apoptótica (condensada y fragmentada) no se manifestaba hasta las 6 h después del tratamiento. El *western blot* para la enzima PARP evidenció resultados similares, y 6 h después del tratamiento sólo se detectó la fragmentación de esta proteína en el tratamiento combinado de FSs.

Estos resultados confirmaron los obtenidos previamente mediante la tinción con H-33258, donde se constató que la típica condensación y fragmentación apoptótica se producía a las 6 h del tratamiento, y no antes.

La pérdida del $\Delta\Psi_m$ en el 50% de las células 1 h después del tratamiento sinérgico (2.4 J/cm²), analizada por citometría de flujo (por DiOC₆(3)), evidenció claramente que era la vía apoptótica mitocondrial la que había sido activada.^{61,250} Los análisis sobre la localización subcelular de la proteína proapoptótica Bax (obtenidos por inmunofluorescencia indirecta) corroboraron que a las 3 h, pero sobre todo a las 6 h después del tratamiento, se había producido, prácticamente en todo el cultivo celular, una relocalización de esta proteína desde el citosol a la mitocondria. De esta manera, la fuerte señal verde fluorescente de Bax aparecía situada en las mitocondrias y no en el citosol, como sucedía en las células control o en las células tratadas con un único FS que no habían inducido la apoptosis. Esta relocalización ha sido descrita en otros procesos de fotosensibilización.^{39,221} Asimismo, los análisis sobre la posible relocalización del citocromo c mostraron resultados complementarios a los de Bax. Mientras que 1 h después del tratamiento de TFD, el citocromo c se encontraba todavía en las mitocondrias, 3 y 6 h más tarde se observó una difusa fluorescencia verde en el citosol. En ese intervalo de tiempo, las células mostraron una condensación y fragmentación de la cromatina típica de la apoptosis. Es bien conocido que Bax, en respuesta a un estímulo apoptótico, sufre una oligomerización y traslocación a la mitocondria, lo que provoca la liberación del citocromo c y otras moléculas al citosol, con la correspondiente activación de las caspasas. De hecho, se ha propuesto que la traslocación de Bax desde el citosol a la mitocondria es una condición necesaria y suficiente para inducir el proceso apoptótico.²⁵¹

Asimismo, estudiamos la cinética de activación de una de las caspasas efectoras más relevantes en la apoptosis, la caspasa-3, no sólo por técnicas de inmunofluorescencia indirecta mediante microscopía confocal, sino también por citometría de flujo, para obtener una cuantificación de la señal de emisión de fluorescencia de esta proteasa en su forma activa. Mediante inmunofluorescencia se detectó un rápido incremento en la señal después del tratamiento sinérgico, que se iniciaba a los 30 min del tratamiento y se mantenía hasta las 3 h. Los datos obtenidos por citometría fueron equiparables a los obtenidos por microscopía. Mediante este análisis pudimos concluir que la máxima activación de la caspasa-3 se producía entre las 2-3 h después del tratamiento combinado, corroborando así su importante papel como caspasa efectora en la vía apoptótica inducida por nuestro tratamiento sinérgico.^{69,71} Estos datos se corresponden con los observados anteriormente en el ensayo TUNEL, en el análisis de la fragmentación de la proteína PARP o de la fragmentación de la cromatina (a las 6 h después del tratamiento).

Por otra parte, pudimos comprobar que el mecanismo de fotosensibilización (apoptosis vs necrosis), dependía claramente de la dosis de irradiación recibida. De modo que, cuando se aumentó la dosis total de luz a 3.6 J/cm², las alteraciones morfológicas de las células se correspondían con las descritas para la necrosis.⁶² En general, en cualquier tipo de tratamiento, cuando la intensidad del

estímulo aplicado es muy elevada, la respuesta generada es de muerte celular por necrosis.¹²⁰ En resumen, el tratamiento sinérgico inducía una entrada progresiva de las células en apoptosis y, 6 h después de la irradiación, la mayoría de las células habían sido inactivadas por desencadenamiento de la vía apoptótica mitocondrial.

En relación con la localización subcelular, el lugar de acumulación de los FSs se ha revelado de especial importancia, puesto que determina la localización subcelular del daño primario después de la irradiación. Teniendo en cuenta que el $^1\text{O}_2$ (principal responsable de los efectos citotóxicos inducidos por la TFD) sólo puede difundir unos 30 nm, y que posee un tiempo de vida media de 1×10^{-7} s en las células,¹⁰⁷ las estructuras celulares que contengan una alta concentración del FS serán las preferentemente dañadas después de la irradiación. Varios factores determinan el patrón de localización subcelular de los FSs, como se ha comentado en apartados anteriores.⁹⁷ Esto hace evidente que la localización de ambos FSs es un factor esencial en el efecto sinérgico observado.

Los resultados obtenidos por microscopía de fluorescencia en células HeLa indicaron que, en nuestras condiciones experimentales, la ZnPc se acumulaba en el aparato de Golgi. Este mismo patrón de localización subcelular ha sido previamente descrito utilizando concentraciones y tiempos de incubación superiores al del presente estudio, en varias líneas celulares (incluida HeLa).^{39,115}

Por el contrario, existen mayores discrepancias acerca de la localización del TMPyP en diferentes líneas celulares. Nuestros análisis de microscopía de fluorescencia mostraron una localización del TMPyP en los lisosomas. Estos resultados son similares a los anteriormente descritos para esta porfirina en células de carcinoma de colon murino.^{252,253} Sin embargo, el grupo de Georgiou *et al.* detectó una localización nuclear del TMPyP en fibroblastos dérmicos humanos.²⁵⁴ Esta relocalización del TMPyP de los lisosomas al núcleo ha sido muy estudiada y es conocido que su inicial localización lisosomal cambia rápidamente a nuclear (se une al ADN nuclear), bien después de la irradiación o bien cuando se emplean concentraciones más elevadas o tiempos de incubación más largos.^{116,191}

En relación con esta observación, los análisis realizados sobre la posible relocalización de estos dos FSs en nuestras condiciones experimentales demostraron que únicamente a las 6 h de finalizar el tratamiento fotodinámico sinérgico, es decir, cuando las células ya estaban muertas, se detectaba una clara relocalización, tanto de la ZnPc como del TMPyP, con las correspondientes señales de fluorescencia en el núcleo celular, lo que concuerda con las observaciones realizadas por otros grupos de investigación.^{191,254,255}

Los resultados obtenidos mediante técnicas espectrofluorimétricas indicaron una acumulación de la ZnPc en el interior de las células HeLa, casi 3 veces superior a la obtenida para el TMPyP. Este hecho confirma la alta eficiencia de los liposomas de fosfolípidos como vehiculizadores de la ZnPc, ya que este FS se utiliza a una concentración 20 veces inferior que el TMPyP.

La identificación de las rutas de señalización por las que se desencadena el proceso apoptótico a través de FSs acumulados en distintos orgánulos está siendo objeto de una intensa investigación, como se recoge en distintas revisiones.^{56,66,97} En el caso de los FSs de acumulación mitocondrial, no resulta sorprendente, teniendo en cuenta el papel fundamental que tiene este orgánulo en la apoptosis.²²⁶ Nuestros resultados indicarían que el aparato de Golgi (para la ZnPc) y los lisosomas (para el TMPyP) son las “dianas” subcelulares directamente afectadas por el tratamiento sinérgico, y por lo tanto responsables del desencadenamiento de la apoptosis.

Dentro de la familia de las caspasas, la caspasa-2 presenta algunas características que no son compartidas por las otras caspasas y que han generado cierto grado de controversia. Además de considerarse una caspasa tanto iniciadora como efectora²⁵⁶, se han descrito distintas localizaciones celulares incluyendo, el núcleo²⁵⁶, el aparato de Golgi²⁵⁷ y el citosol.²⁵⁸ Además, se ha descrito que la caspasa-2 tiene una importante implicación en la muerte celular inducida, entre otros factores, por ROS.^{69,71}

En este sentido, los resultados obtenidos por inmunofluorescencia indirecta para la proteína golgina-130, una proteína estructural del aparato de Golgi, confirmaron que el tratamiento fotodinámico sinérgico afectaba a la estructura de este orgánulo. A las 3, y especialmente a las 6 h después de la aplicación de dicho tratamiento, las células presentaron una desorganización de este orgánulo, observándose una débil fluorescencia difusa y citoplasmática. Trabajos previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que la ZnPc induce, en células A-549, una activación de la caspasa-2 localizada en el aparato de Golgi, que sería la responsable del inicio de la respuesta apoptótica.³⁸ La rápida desorganización del aparato de Golgi después de nuestro tratamiento confirmaría estos resultados en células HeLa.

Por otro parte, está ampliamente descrito que cuando un FS se acumula en los lisosomas, el tratamiento fotodinámico puede dañar la membrana de estos orgánulos debido al incremento de ROS inducido después de la irradiación. Así, se produciría la permeabilización de la membrana lisosomal y la liberación al citosol de enzimas lisosomales (como las catepsinas B y D), encargadas de desencadenar una apoptosis independiente de caspasas o de transmitir la señal hasta la mitocondria, desencadenando la vía mitocondrial de la apoptosis, induciendo la liberación del citocromo c y la activación de las caspasas 9 y 3.^{2,259,260} Varios estudios han demostrado que la liberación de citocromo c puede ser activada desde las catepsinas lisosomales que inducen la rotura de Bid a t-Bid, capaz de inducir la relocalización de Bax.^{87,88}

En este mismo sentido, la permeabilización de la membrana lisosomal (*Lysosomal Membrane Permeabilization*, LMP) está considerada como un mecanismo capaz de inducir la muerte celular. Se ha descrito que una ruptura completa de los lisosomas provoca una incontrolada muerte celular por necrosis. Por el contrario, una LMP parcial y selectiva, induce el desmantelamiento controlado de la célula por apoptosis. Diversas investigaciones indican que en respuesta a algunos estímulos, no todos los lisosomas son permeabilizados al mismo tiempo, aunque los mecanismos para explicar esta heterogeneidad en la respuesta celular, están siendo difíciles de entender. También se ha descrito que dependiendo de la naturaleza y la intensidad del estímulo, la cantidad y el tipo de catepsinas liberadas al citoplasma, así como de la abundancia de inhibidores de las catepsinas, la LMP puede desencadenar una variedad de morfologías asociadas a la muerte celular que van desde la apoptosis clásica a la necrosis.²⁶¹ Además, se ha determinado que la producción intracelular de ROS, con una actividad espacial limitada, puede inducir la permeabilización de los lisosomas y desencadenar la vía apoptótica mitocondrial a través de Bax, lo que precede a la liberación de citocromo c desde las mitocondrias.²⁶²

Nuestros resultados de la tinción vital del naranja de acridina (AO) para los lisosomas, después del tratamiento sinérgico apoyan esta propuesta, ya que el TMPyP (como el porfírico catiónico) presenta una localización lisosomal en nuestras condiciones experimentales. Después de la irradiación (a 1-2 h), las células tratadas con el protocolo combinado revelaron cambios generalizados en el patrón de

fluorescencia del AO, que disminuía progresivamente, aunque no desaparecía en su totalidad. De modo que el tratamiento fotodinámico sinérgico, parecía inducir una permeabilización parcial de las membranas de los lisosomas. Posiblemente, no todos los lisosomas sean capaces de acumular cantidades suficientes de TMPyP y/o bien sólo se producía una permeabilización parcial cuando la dosis de irradiación fue de 2.4 J/cm^2 , mientras que cuando la dosis de irradiación aumentó a 3.6 J/cm^2 , se produciría una LMP total que desencadenaría una respuesta necrótica.

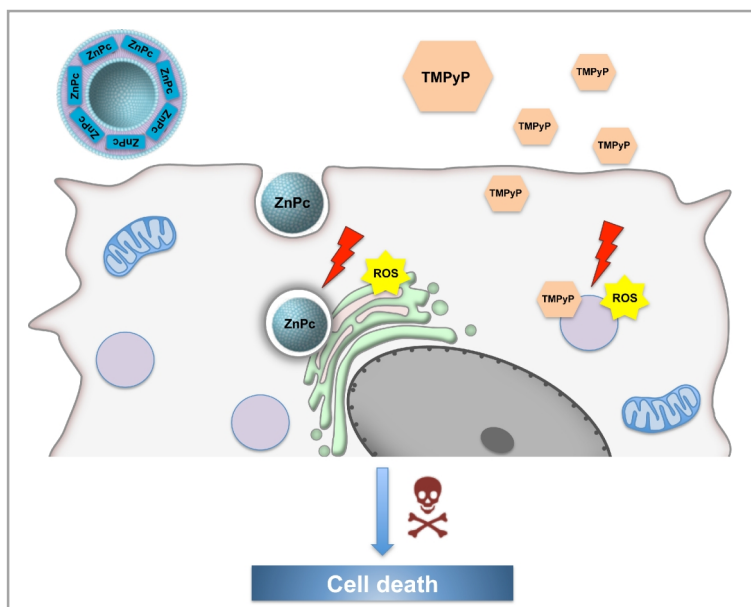
Sin embargo, a pesar de todo lo explicado hasta ahora, todavía existía otra posibilidad en la ruta de señalización apoptótica por TFD. Se trata de los fenómenos de relocalización del FS durante la irradiación, lo que induciría un daño celular indirecto, distinto al lugar de acumulación, que también podría estar implicado en la respuesta al daño generado. Diversas publicaciones describen este fenómeno para distintos FSs. [dea40, 41]. En este sentido, nuestros estudios de relocalización con los dos FSs han indicado que, sólo 6 h después del tratamiento sinérgico, la ZnPc y el TMPyP se detectaron en el núcleo de las células muertas (por apoptosis), mientras que los procesos de relocalización de los FSs descritos hacen referencia a un cambio de localización, que comienza a los pocos segundos/minutos de iniciar la irradiación.^{252,263}

Todos estos resultados indicaban que el tratamiento sinérgico con los dos FSs de distinta localización subcelular, después de la irradiación, es capaz de generar ROS en dos lugares distintos de la célula (aparato de Golgi y lisosomas), que al producirse de forma simultánea, inducen un daño a la célula de una intensidad suficiente para activar las rutas bioquímicas que originan una masiva respuesta apoptótica, que no se alcanza por la acción individual de cada FS.

A continuación, realizamos estudios complementarios para poder confirmar la formación de ROS como el principal estímulo inductor de la ruta apoptótica, después del tratamiento combinado. La inducción de la generación intracelular de ROS se evaluó con la sonda DCFH-DA. El nivel de ROS

aumentó gradualmente con el tiempo después de la irradiación, alcanzando un valor máximo en el intervalo entre los 30 min y 1 h, lo cual concuerda con todos los análisis explicados hasta el momento.

Tomando en cuenta todos estos resultados, proponemos un modelo para los mecanismos de actuación del tratamiento fotodinámico sinérgico combinando ZnPc y TMPyP, en el que mostramos que un daño simultáneo a dos orgánulos celulares (en nuestro caso aparato de Golgi y lisosomas), puede inducir una generación de ROS intracelular suficiente para inducir un efecto sinérgico, fotoinactivando las células



Modelo propuesto para el mecanismo de inactivación del tratamiento fotodinámico combinando ZnPc y TMPyP, en el que las estructuras celulares que contienen una elevada concentración de cada FS, serán las preferentemente dañadas después de la irradiación, debido a la elevada concentración local de ROS generados.

tumorales en cultivo.

Respecto a las alteraciones del citoesqueleto, los microtúbulos (MTs) controlan numerosos e importantes procesos celulares, como ya se ha comentado anteriormente.²³¹ Además son los “blancos” celulares de muchos tratamientos antitumorales.²³² Diversas publicaciones han demostrado que los MTs pueden ser dianas subcelulares de los tratamientos fotodinámicos con diversos FSs, incluyendo la ZnPc y el TMPyP actuando individualmente.^{42,49,113,234,264}

Sin embargo, los resultados de esta investigación son diferentes a los descritos hasta el momento para la mayoría de los FSs. Mediante técnicas de inmunocitoquímica comprobamos que el tratamiento sinérgico inducía una clara desorganización de los MTs interfásicos (a las 3 h), que evolucionaba a las 6 h con un incremento en la despolimerización de los mismos, unida a la traslocación de la tubulina hacia el núcleo, que ya se estaba condensado y fragmentado. Resultados muy similares, con un colapso de la red de MTs seguida de una relocalización nuclear de la tubulina, se han publicado recientemente en células de carcinoma de próstata, utilizando un derivado feoforbídico como FS. Los autores de esta investigación relacionan estas alteraciones con eventos nucleares como la condensación de la cromatina durante la apoptosis.²³³

Por otra parte, los MFs de actina están involucrados en una amplia variedad de funciones celulares, ya mencionadas anteriormente. Además, también interactúan con proteínas implicadas en la adhesión celular, tales como: cadherinas, cateninas, vinculina, α -actinina, etc.²³⁷ Diversos autores han descrito cambios inducidos en el citoesqueleto de actina en el proceso de fotosensibilización celular. La mayoría de ellos señalan una pérdida completa de organización y disposición de las fibras de estrés cuando el tratamiento fotodinámico aplicado induce necrosis o bien, se producen reorganizaciones periféricas de los MFs de actina, acopladas con un redondeamiento celular que antecede a la pérdida de adhesión, cuando se desencadena la apoptosis.^{37,205,237}

El análisis de los MFs de actina evidenció que, después del tratamiento sinérgico, las células sufrían progresivas alteraciones en la organización y distribución de la actina-F y la proteína vinculina, de forma paralela a la evolución apoptótica. Transcurridas 3 h después de la irradiación, se observó una reorganización de los MFs de actina-F, que pasaban a disponerse en una estructura en forma de anillo rodeando al núcleo, así como en las numerosas prolongaciones en forma de filopodios, que ya se habían observado en microscopía de contraste de fase. A las 6 h del tratamiento, el marcaje con faloidina-rodamina quedaba reducido a una pequeña estructura esférica localizada entre los núcleos fragmentados, pero las células apoptóticas permanecían adheridas al sustrato de crecimiento. En relación con el efecto de la TFD se han descrito alteraciones en las proteínas de adhesión y en los MFs de actina de células resistentes a tratamientos con TFD.¹¹⁷

Si bien uno de los objetivos de esta investigación era conseguir una mayor eficiencia del tratamiento para inactivar las células tumorales, un resultado secundario bastante sorprendente fue que las células pasaran el proceso completo de la apoptosis sin perder la adhesión al sustrato. En relación con este fenómeno, la pérdida de adhesión de las células de la matriz extracelular también se conoce como un potente inductor de la apoptosis.⁷² La ausencia de unión de las células a la matriz extracelular activa un mecanismo de muerte celular denominado anoikis, que está mediado por diferentes vías de señalización. Sin embargo, las células tumorales se caracterizan por ser capaces de evitar la anoikis en respuesta a la pérdida de adhesión. Por lo tanto, la resistencia a la anoikis está

claramente relacionada con la capacidad de las células tumorales para inducir procesos metastásicos, como se recoge en la reciente revisión de Paoli et al.¹⁰⁵

Muchos estudios han remarcado que la quinasa de adhesión focal (FAK) desempeña un papel clave en la transformación neoplásica, la metástasis y la progresión del cáncer.²⁶⁵ Sin embargo, los datos sobre el papel de la FAK en la citotoxicidad inducida por diferentes agentes son un tanto contradictorios, y se han descrito tanto la sobreexpresión como la disminución de la actividad de FAK.²⁶⁶ Nuestros resultados muestran que FAK se encuentra en los complejos de adhesión focal de las células HeLa control (no tratadas). Sin embargo, después del tratamiento de TFD sinérgico, la señal de FAK disminuye notoriamente en función del intervalo de tiempo transcurrido, siendo mínima (aunque todavía visualizable) a las 24 h. Al mismo tiempo, las células también se someten a una reorganización profunda e irreversible de la actina-F, como se ha explicado anteriormente, que viene acompañada de alteraciones de la morfología celular. Es importante resaltar que a las 24 h después del tratamiento combinado, ninguna célula mostró recuperación en la disposición tanto de la FAK como de la actina-F. Este hecho proporciona un fuerte apoyo a la hipótesis de que el fototratamiento combinado es capaz de escindir o degradar gran parte de la proteína FAK fosforilada, pero sin que se pierda la adhesión. De modo que para explicar este fenómeno hay tres posibles respuestas: i) la mínima expresión de FAK que se detecta es capaz de mantener la adhesión de las células al sustrato, ii) se producen cambios en la expresión de otra proteína de adhesión distinta de FAK, y iii) que estén implicados ambos procesos. Obviamente, se necesitan nuevos ensayos para resolver este enigma. Teniendo en cuenta el elevado número de proteínas implicadas en la adhesión-señalización celular, se abordará en un futuro próximo, con un ensayo de tipo *microarray* para proteínas implicadas en la adhesión de la célula a la MEC.

En relación a este mismo hecho, los ensayos de curación de heridas también corroboraron que la migración de las células HeLa se inhibía completamente después del tratamiento fotodinámico. En fibroblastos tratados con Verteporfina y en células de carcinoma nasofaríngeo tratadas con protocolos de TFD con ALA se ha detectado una disminución en la fosforilación de FAK.^{113,267} Varios datos indican que la generación de ROS después de un tratamiento dado es capaz de producir la escisión de la FAK o la disminución de la actividad de esta proteína.^{268,269} Teniendo en cuenta que los niveles de ROS son un factor importante para evitar la anoikis en células tumorales, y que la TFD produce ROS, es evidente que el tratamiento fotodinámico aquí descrito presenta notables ventajas.¹⁰⁵

Los resultados hasta aquí descritos indican que la combinación de ZnPc + TMPyP + 2.4 J/cm² es un protocolo muy eficaz para inactivar células tumorales en cultivo, sin evadir la apoptosis, como sucede en las células tumorales resistentes a terapia. Es de destacar que se ha descrito un aumento de la expresión de FAK fosforilada y de la proteína vinculina en células de carcinoma de células escamosas (SCC-13) resistentes a la TFD con Me-ALA.¹¹⁸ En la misma investigación se detectaron más fibras de estrés después de la TFD. Obviamente, como se acaba de comentar, son necesarias nuevas investigaciones para identificar qué moléculas de adhesión y qué vías de señalización son capaces de inducir una respuesta apoptótica masiva sin perder la adhesión de las células al sustrato.

3B. Ensayos *in vivo*

Numerosos estudios han documentado el uso de estrategias de TFD junto con los tratamientos más convencionales contra el cáncer, para mejorar la respuesta antitumoral. Sin embargo, es muy escaso el número de publicaciones donde se estudia el efecto inducido por la combinación de dos FSs en una única dosis de tratamiento. A pesar de ello, es evidente que el objetivo final de las modalidades combinadas se dirige claramente hacia la obtención de una mayor eficacia terapéutica.¹³¹

En los últimos años, la hipótesis de tratamientos contra el cáncer basados en el uso simultáneo de diferentes estrategias moleculares ha emergido con fuerza, y por lo tanto sugiere el uso de la TFD en combinación con otros recursos terapéuticos. Sin embargo, aún se está desarrollando el FSs ideal para tratamientos *in vivo*, aquél que favorezca al máximo la selectividad por el tejido tumoral.¹³¹ Así, la utilización de “vehículos de entrega” para la administración de agentes fotodinámicos por vía sistémica ha sido objeto de un activo debate y se han llevado a cabo en el ámbito de la TFD varios estudios experimentales, tanto de investigación básica como clínica.⁴⁷ También se está buscando una vía para mejorar la posible combinación de la TFD con otras terapias, lo que implica, por ejemplo, una administración dirigida del FS y del fármaco mediante el uso de sistemas (nanoplateformas) diseñados para una distribución selectiva de los componentes que forman la terapia combinada. Esto podría, finalmente, ascender a la TFD a un nivel de vanguardia de la terapia del cáncer.

Los resultados obtenidos en la presente investigación señalan claramente que la combinación de ZnPc + TMPyP puede actuar retrasando el crecimiento de un tumor trasplantado subcutáneamente en ratones experimentales. Los mecanismos de acción de la TFD *in vivo* son complejos, dependiendo de muchos factores como: el tipo de FS utilizado, la dosis y el tipo de luz, el sistema de administración de los FSs, las condiciones de tratamiento y el tipo de tumor. La formulación de un FS y su sistema de entrega juegan un papel fundamental en su actividad, ya que modulan su farmacocinética, absorción, distribución subcelular y localización en el tumor.²⁷⁰

En la práctica, los FSs, que por lo general presentan una alta selectividad por los tejidos tumorales, se caracterizan por poseer un grado relativamente alto de hidrofobicidad. De ahí que su inyección intravenosa directa en el torrente sanguíneo se tenga que realizar tras su previa incorporación en vehículos portadores lipofílicos, incluyendo entre estos los liposomas. El uso de tales vehículos permite la inyección de mayores cantidades de FS, superando el problema de la baja solubilidad en agua, y a menudo reducen la agregación del compuesto, que se ve favorecida por los medios polares y que disminuye la eficiencia de la TFD. Por lo tanto, siguiendo la idea que dos de los agentes de TFD que están actualmente siendo utilizados en ensayos clínicos, como Foscan® o BPD-DA, están asociados con sistemas de administración adecuados, la ZnPc utilizada en el presente trabajo se incorporó en una formulación de liposomas.⁴⁷

En este apartado se comentarán los resultados obtenidos en los tratamientos fotodinámicos llevados a cabo en ratones portadores de tumores, explorando la TFD combinada (ZnPc + TMPyP) inyectada por vía intravenosa como una alternativa a la monoterapia. La hipótesis de este tratamiento se ha basado en seguir un planteamiento similar a los protocolos clínicos utilizados en quimioterapia, donde se utiliza una combinación de fármacos antineoplásicos, con el fin de reducir la posible resistencia de las células tumorales a terapia y minimizar los efectos secundarios no deseados.

La primera fase del estudio se realizó utilizando la línea celular tumoral murina B78H1, ya que era

el tipo celular que iba a inyectarse subcutáneamente para los ensayos *in vivo*. Los resultados obtenidos fueron totalmente similares a los observados para las tres líneas celulares humanas analizadas previamente. El efecto sinérgico obtenido con el tratamiento combinado (2.4 J/cm^2) evidenciaba la eficiencia del mismo, ya que no sólo era capaz de inactivar líneas tumorales humanas en cultivo, sino también murinas (inactivación celular $> 95\%$) y, como se ha comentado en apartados anteriores, el efecto final de la TFD puede variar según el genotipo de la línea celular utilizada.^{37,97,108,248}

Posteriormente, se procedió a identificar el mecanismo de muerte celular desencadenado en esta línea celular después del tratamiento sinérgico, siguiendo los mismos criterios morfológicos y bioquímicos empleados en las anteriores investigaciones de nuestro grupo. De esta manera, se pudo concluir que la vía de inactivación principal inducida después de la TFD era la apoptosis, si bien esta ruta de señalización se desarrollaba más lentamente que en el caso de las células HeLa, observándose el mayor porcentaje de células apoptóticas a las 24 h después de finalizar el tratamiento, y no a las 6 h que necesita la línea HeLa.

Los estudios del análisis de la posible desorganización inducida en el citoesqueleto (MTs y MFs de actina), así como en algunas proteínas implicadas en la adhesión celular (vinculina), después del tratamiento sinérgico, demostraron el mismo patrón de alteración progresiva de dichos componentes celulares que el observado en células HeLa, aunque fue especialmente destacable a las 18-24 h después de finalizar dicho tratamiento.

Teniendo en cuenta los satisfactorios resultados obtenidos *in vitro*, decidimos ensayar el tratamiento combinado en tumores sólidos inducidos subcutáneamente en ratones C57BL/6 mediante la inyección de 1×10^6 células de melanoma amelanótico murino (B78H1).

Lo primero que analizamos fue la capacidad de localización tumoral de ambos FSs inyectados por vía intravenosa (i.v.), a distintos intervalos de tiempo después de la inyección. Los primeros estudios *in vivo* revelaron que, a las 24 h de la inyección, se obtenía la máxima acumulación de los FSs en la zona tumoral. Las imágenes mostraron una acumulación muy intensa y selectiva. Esta es una propiedad fundamental de un FS para evaluar su posible aplicación clínica. Los resultados obtenidos coinciden con los descritos anteriormente para el TMPyP, con las mismas dosis de FS, aunque en otro modelo tumoral (un fibrosarcoma MS2).¹⁰⁶ Por otra parte, cuando la administración de cada FS se realizó por vía intratumoral, el intervalo de tiempo óptimo para detectar la máxima acumulación del FS en el tumor resultó ser de 1 h para ambos FSs (datos no mostrados en la presente Tesis Doctoral). Recientemente, algunas investigaciones consideran más adecuada este tipo de administración, ya que se han obtenido mejores respuestas tumorales respecto a la inyección intravenosa, aunque este tema aún no está completamente resuelto.²⁷¹

A continuación se analizó la farmacocinética inyectando los FSs tanto de manera individual como combinada. La distribución de FSs inyectados sistémicamente varía según sus propiedades físico-químicas, y depende de las proteínas plasmáticas que controlan su distribución entre los diferentes compartimentos del tejido tumoral. En particular, los FSs hidrofílicos son transportados principalmente en el torrente sanguíneo por la albúmina sérica y se localizan en el estroma vascular del tumor, mientras que los FSs hidrófobos principalmente se unen a las lipoproteínas, incluyendo las lipoproteínas de baja densidad (LDL, del inglés *Low-density lipoprotein*), y se localizan preferentemente en las células neoplásicas, así como en los macrófagos asociados a tumores.¹⁷² En el caso de la ZnPc se ha descrito

que actúa induciendo un daño directo a las células tumorales,²⁷² mientras que la porfirina catiónica actúa principalmente lesionando la vasculatura tumoral.²⁷³ Este distinto mecanismo de regresión tumoral está relacionado con la vehiculización del FS.²⁷⁴

Es conocido que la acumulación de macromoléculas en los tumores se debe principalmente al denominado efecto EPR (comentado en la Introducción), que consiste en la extravasación de los fármacos en el tejido tumoral debido a la mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos tumorales, junto con el escaso drenaje linfático de esa zona, lo que conduce a que el FS/fármaco se retenga en mayor cantidad en el tejido tumoral.¹⁷⁹ Este efecto es también dependiente del tamaño de las NPs utilizadas para vehiculizar un fármaco; pequeños portadores se pueden difundir dentro y fuera de los vasos sanguíneos del tumor debido a su pequeño tamaño y, por lo tanto, la concentración efectiva del fármaco en el tumor disminuye en comparación con los vehículos de mayor tamaño.²⁷⁰

En relación a los resultados obtenidos para la ZnPc, cabe destacar la ausencia de este FS en el suero sanguíneo 96 h después de la inyección, lo que muestra una relativamente rápida eliminación del organismo, que junto con la ausencia de detección en la piel, señala una alta especificidad de este FS por el área tumoral, lo que es una importante propiedad fotodinámica requerida en TFD. Este hecho, aseguraría la ausencia de una posible fotosensibilidad cutánea derivada del tratamiento. Además, al no atravesar la barrera hematoencefálica se descartarían posibles daños al sistema nervioso central. Asimismo, se detectó la mayor acumulación de este FS en los órganos que constituyen el sistema retículoendotelial, tales como el hígado y el bazo. Esta observación coincide con la conocida tendencia de los agentes de TFD hidrófobos de ser eliminados del organismo a través de la ruta bilis-intestino.^{47,106,179} La máxima acumulación en el área tumoral se detectó a las 24 h, lo que concuerda con datos obtenidos por otros grupos de investigación para este FS o para otros fármacos vehiculizados en liposomas.^{47,270} Diversas publicaciones hacen referencia a que la cinética de acumulación en el tumor de un FS incorporado en liposomas, como por ejemplo el temoceno, mostraba el nivel más alto a las 24 h después de la inyección. Además, el temoceno incorporado en liposomas también mostró una mejor selectividad por el tumor en relación con el tejido normal y una mejor respuesta fotodinámica.²⁷⁰ El grupo de García-Díaz *et al.* demostró que los liposomas eran el mejor vehículo para administrar el temoceno, en términos de lograr la mayor internalización celular del FS y la especificidad por el tejido tumoral.²⁷⁰

En el caso del TMPyP, a las 96 h después de la inyección, tampoco se detectaron restos de este FS en el suero sanguíneo o en la piel. Al igual que la ZnPc, tampoco atravesó la barrera hematoencefálica. Sus principales vías de eliminación fueron el hígado y los riñones. En la piel de la zona peritumoral se acumuló en mayor medida que la ZnPc, ya que no posee una selectividad tan elevada al no inyectarse vehiculizada, pero es importante destacar que a las 24 h el nivel de acumulación del TMPyP en la piel era ya casi inapreciable. Esta baja acumulación cutánea minimizaría el riesgo de efectos secundarios no deseados (fotosensibilización cutánea). Asimismo, se encontraron pequeñas cantidades de FS en el pulmón, especialmente a intervalos de tiempo cortos posteriores a la inyección, probablemente debido a la posible captura de partículas coloidales por los capilares pulmonares. La máxima acumulación en el área tumoral se detectó a las 3 h. Esto hacía suponer que si se irradiaba el área tumoral 1 o 3 h después de la inyección i.v. se podría favorecer un efecto de la TFD a través del daño a la vasculatura de la lesión neoplásica, un hecho menos probable a intervalos de tiempo posteriores, ya que no es detectable

TMPyP en el suero sanguíneo a las 24 h.

En el caso de la farmacocinética combinada, los resultados fueron muy similares a los obtenidos en los análisis realizados con la inyección individual de cada FS, lo que descartaría una posible agregación de ambos FSs al inyectarse de manera combinada. Tampoco se observó un incremento en la toxicidad de ambos. Cabe destacar que, en la actualidad, uno de los efectos secundarios no deseados de la TFD es la sensibilidad cutánea persistente, como ocurre por ejemplo con el Photofrin®. Este hecho no se ha observado con nuestro tratamiento.

Una vez completado el estudio sobre la farmacocinética de cada FS, se evaluó la actividad antitumoral *in vivo* de la estrategia de TFD combinada. El tiempo entre la administración del FS y el tratamiento de luz también es un parámetro crítico para la eficacia de la TFD.¹⁷⁹ De esta manera, se procedió a realizar el tratamiento transcurridas 3 o 24 h después de la inyección, cuando una cantidad significativa de FS estaba aún presente en el suero sanguíneo, o para permitir la acumulación de los FSs en la lesión neoplásica.

Las respuestas a TFD de tumores trasplantados en modelos animales con diferentes FSs y protocolos muestran una considerable variabilidad. De esta manera, se encuentran resultados que van desde la regresión parcial, o que inducen un retraso en el crecimiento del tumor, hasta otros que inducen una regresión muy prolongada en el tiempo, y en algunos casos la regresión completa.²⁷⁵ Es frecuente obtener una remisión temporal de los tumores sometidos a TFD, pero después de un periodo de tiempo, estos comienzan a crecer de nuevo.²⁷⁵ Las recaídas probablemente se originan a partir de células tumorales que no hayan sido inactivadas por el tratamiento de TFD, lo que podría ser debido a las variaciones en la penetración de la luz dentro del tumor, o a variaciones en la disponibilidad de oxígeno en esa zona, entre otros factores.¹⁷⁹

Los estudios histológicos realizados nos permitieron comprender mejor los mecanismos implicados en la fotoinactivación celular después del tratamiento combinado. Según las imágenes obtenidas por microscopía óptica y electrónica, parece razonable plantear la hipótesis de que nuestro tratamiento actúa a través de un daño vascular, y además induce un considerable daño a las células tumorales, como inequívocamente confirmaron las numerosas células apoptóticas (y algunas necróticas) observadas en las muestras procesadas, así como el extenso daño inducido en las células endoteliales. Estos resultados pueden correlacionarse con los obtenidos en otras publicaciones de TFD *in vivo*.^{47,106,273} La acción antiangiogénica promovida por la TFD está en línea con diversos enfoques propuestos recientemente, cuyo objetivo es inhibir el crecimiento del tumor al detener el suministro sanguíneo.

Las posibles implicaciones clínicas de estos resultados incluyen: i) la tasa de crecimiento de los tumores tratados con TFD fue más lenta que la de los tumores de ratones control no tratados; ii) empleando el tratamiento combinado se obtiene una mayor eficacia terapéutica en relación a los tratamientos con un solo FS; y iii) el daño inducido por la combinación de los dos FSs no recae sólo en las células tumorales, sino que también parece afectada la vasculatura tumoral.

Estas características son importantes para las futuras aplicaciones oncológicas. Teniendo en cuenta que la vida de los ratones de laboratorio es de alrededor de 2 años, una prolongación de una semana en la supervivencia de un ratón sería equivalente a 10 meses en humanos. Aunque lejos de ser un estudio totalmente completado, los resultados presentados aquí indican que los tratamientos combinando dos FSs con dianas terapéuticas diversas podrían representar estrategias muy útiles para estudios de TFD en

Oncología experimental y clínica.

En resumen, valorando todos los resultados obtenidos en la presente investigación, podríamos concluir que la combinación de la ZnPc y el TMPyP incrementa la eficacia de la TFD para inducir una fotoinactivación sinérgica de células tumorales por apoptosis con dosis mínimas, y reúne prácticamente todas las propiedades que se han propuesto para poder definir a un único FS como “óptimo” ya que: i) se requieren condiciones de tratamiento que evitarían efectos secundarios, si la localización tumoral *in vivo* no fuera suficientemente específica. ii) Ambos FSs son compuestos puros (no mezclas que dificultan la investigación). iii) Se activan con luz roja, y iv) parecen poseer excelentes propiedades de acumulación tumoral.

En otras palabras, el potencial de este tratamiento fotodinámico sinérgico puede suponer en un punto de partida para promover un cambio importante en el desarrollo de la TFD, alcanzándose el objetivo final de las modalidades combinadas: la obtención de una máxima eficacia terapéutica con las menores dosis de tratamiento posibles.

3C. Los cultivos celulares 3D: una herramienta imprescindible en TFD

Como se ha comentado en la introducción, para tener éxito en el desarrollo y la evaluación de nuevos fármacos es crucial utilizar sistemas celulares que reproduzcan con precisión el fenotipo del tejido diana, con el fin de obtener datos biomédicos fiables que se correlacionen posteriormente con las pruebas *in vivo*. La eficacia de la TFD *in vivo* depende de un gran número de parámetros, entre los que destacan: el grado de oxigenación del tejido, la concentración de FS y la distribución y dosimetría de la luz. Sin embargo, tradicionalmente las terapias clínicas se han desarrollado utilizando sistemas de cultivos celulares en monocapa, donde la mayoría de estos factores no están bien reproducidos. Estos sistemas convencionales 2D no logran capturar con la precisión requerida la complejidad de los tejidos, ya que no tienen en cuenta los componentes extracelulares que están presentes *in vivo*, ni las diferencias en el fenotipo entre las células cultivadas en monocapa y las células que forman los tejidos.^{29,188,189,191}

Por lo tanto, hoy en día existe una alta demanda de los modelos que recrean precisamente la complejidad de los tejidos humanos, mientras que conservan la capacidad para el estudio a gran escala, así como el análisis de imagen a nivel celular. En este aspecto, los sistemas celulares 3D son estructuras mucho más complejas, atractivas y útiles, ya que integran múltiples señales químicas y mecánicas procedentes de la MEC y de las células adyacentes, imitando más de cerca al escenario *in vivo*.⁴ En este sentido, los cultivos celulares 3D se consideran actualmente como un puente entre los sistemas *in vitro* convencionales y los sistemas *in vivo*.

En la presente Tesis Doctoral se han presentado diversos modelos celulares 3D para la evaluación de diferentes tratamientos de TFD. Además, se utilizaron con el fin de comprobar si el tratamiento combinado sinérgico era efectivo en la inactivación de células tumorales en este tipo de cultivos celulares, y si las dosis de tratamiento necesarias para conseguir un porcentaje significativo de muerte celular eran similares a las utilizadas en los tratamientos *in vitro* o, por el contrario, estaban más próximas a aquellas utilizadas para los tratamientos llevados a cabo *in vivo*.

Los primeros experimentos realizados en colaboración con el grupo de la Dra. Hasan demostraron

la validez del modelo 3D en MatrigelTM, tanto de células OVCAR-5 como MIA PaCa-2, para evaluar el nivel de fotcitotoxicidad inducido por distintos protocolos de TFD con BPD-MA. Además, el análisis mediante microscopia de campo oscuro nos permitió observar diferencias, tanto en el fenotipo de ambas líneas celulares como en la morfología y tamaño de los nódulos que forman las células. Es importante señalar que, la determinación precisa del tamaño del nódulo es un parámetro básico que debe ser controlado antes de realizar nuevos protocolos de TFD, ya que hay que asegurar que el tamaño de los nódulos sea de unos 200 μm para comenzar dichos tratamientos, y cada línea celular prolifera a un ritmo diferente.

A continuación, se pudo determinar la eficacia del ensayo de viabilidad Live/Dead para analizar la supervivencia celular en cultivos 3D después de diferentes tratamientos fotodinámicos. Además, se observó la eficacia del BPD-MA para inactivar células tumorales OVCAR-5 en cultivos 3D. Previamente, el grupo de Rizvi *et al.* había descrito que la TFD con BPD-MA cambiaba la distribución del tamaño de los nódulos de OvCa hacia nódulos más pequeños, y que también interrumpía la arquitectura nodular, creando tumores que eran más vulnerables a posteriores tratamientos de quimioterapia, por ejemplo con carboplatino.¹²⁶ Este resultado representaba un gran avance, ya que la alta densidad celular de los tumores es una barrera crítica para la penetración y la acumulación de los agentes quimioterapéuticos. Conviene destacar que el análisis de estos datos requiere la utilización del complejo programa informático MATLAB.

Varios grupos de investigación han utilizado modelos 3D para analizar la eficacia de distintos tratamientos de TFD con un único FS, o de tratamientos de TFD combinados con agentes quimioterapéuticos.^{126,192,276} Sin embargo, nosotros hemos analizado por primera vez el efecto de un tratamiento de TFD combinando dos FSs en cultivos 3D. Mediante el uso de cultivos 3D hemos sido capaces de recrear la limitación de oxígeno y de difusión de medicamentos que tiene lugar en los sistemas *in vivo*, y de analizar su efecto biológico, algo muy importante ya que es la base del desarrollo de la resistencia celular a la terapia.

El grupo del Dr. Semino del IQS (Universidad Ramón LLull) está trabajando con un modelo 3D basado en el hidrogel del péptido autoensamblable RAD16-I, conocido comercialmente como BDTM PuraMatrixTM, que está compuesto por una secuencia de 16 aminoácidos.^{29,191} En relación con la TFD, este hidrogel permite el análisis de los efectos intrínsecos de la arquitectura 3D y los gradientes moleculares (fenómenos de transferencia de masa) en comparación con los modelos 2D, evitando la influencia de las señales bioquímicas.

Los resultados que obtuvimos revelaron que la eficacia de la TFD fue drásticamente menor en los sistemas 3D que en los 2D. De hecho, la inactivación completa del cultivo sólo se observó cuando se empleó una concentración de FS 20 veces más alta, o cuando se mantuvo un flujo continuo de oxígeno durante los tratamientos de TFD. Además, se detectaron células libres de fármaco y/o hipóxicas, que podían no ser afectadas por el tratamiento. Esta aparente paradoja se podría explicar por la activación de una cascada de señalización de muerte que rompería el microambiente de protección creado por la limitación de oxígeno y FS.^{29,191}

Para esta investigación se seleccionaron cultivos de células HeLa, por ser una de las líneas celulares establecidas más utilizadas en los laboratorios de todo el mundo, y de células hNDF porque algunas afecciones de la piel, tales como el cáncer cutáneo no melanoma, la queratosis actínica, la psoriasis, el

acné, etc., son uno de los principales objetivos terapéuticos de la TFD. Por otra parte, dado que los fibroblastos son uno de los principales constituyentes del estroma tumoral, el modelo de cocultivo 3D se podía utilizar adicionalmente para examinar los efectos terapéuticos sobre los fibroblastos en cocultivo con células tumorales epiteliales.

Por otro lado, los cultivos 3D basados en andamios naturales (como el colágeno), representan una buena alternativa a los cultivos basados en andamios proteicos sintéticos, como RAD16-I, ya que proporcionan el espectro de las señales químicas y físicas de un tumor, pero, al mismo tiempo, esta mezcla de señales dificulta el aislamiento de efectos de factores como los fenómenos de transferencia de masa. Así, se optó por usar ambos modelos, ya que en la matriz RAD16-I la influencia de señalización bioquímica está ausente.

Nuestros resultados corroboran los obtenidos previamente por *Alemany-Ribes et al.* ya que el tratamiento combinado utilizando las dosis empleada en cultivos 2D que inducía necrosis no ejerció ningún efecto citotóxico en los modelos 3D utilizados.¹⁹¹ La inactivación casi completa de los diferentes cultivos sólo se observó cuando se emplearon las mismas concentraciones de FS que las utilizadas en los ensayos *in vivo*, aunque combinadas con una dosis de luz bastante inferior (300 vs 70 o 50 J/cm²). En algunos casos, durante el análisis de las muestras incubadas con ZnPc en cultivos de colágeno, se encontraron poblaciones de células más resistentes a TFD, que exhibían un patrón de supervivencia radial, en la que el núcleo de la construcción, mantenía un porcentaje mayor de células viables.

Un dato muy interesante derivado de nuestros estudios fue observar respuestas diferenciales al mismo tratamiento según el tipo de matriz 3D utilizado. El efecto de la terapia combinada fue más eficaz para inactivar células tumorales en cultivos 3D de colágeno. Este hecho podría atribuirse a diferencias en la estructura de ambas matrices, o a la influencia de las señales bioquímicas. Según los análisis realizados por SEM, la matriz de colágeno tiene un tamaño de poro mayor que la del péptido RAD16-I (a una concentración de 0.5%), lo que permitiría una mayor difusión del oxígeno al interior de la matriz y una mayor acumulación de los FSs, lo que a su vez induciría una mayor citotoxicidad. Esto es un factor importante a tener en cuenta a la hora de comparar los resultados sobre la eficacia terapéutica de un tratamiento concreto, ya que el efecto de un mismo protocolo de TFD puede variar según el tipo de matriz 3D utilizada y de la línea celular, como sucede en los cultivos 2D y en los modelos *in vivo*.

En el caso de la matriz de RAD16-I, la viabilidad observada fue algo superior en el caso de los fibroblastos hNDF, indicando una mayor efectividad de nuestro tratamiento para la inactivación de células tumorales en cultivo frente a células no tumorales, un hecho que influye en la selectividad de la TFD *in vivo*. Es importante destacar que los modelos 3D pueden imitar el patrón de expresión génica y los gradientes moleculares de los sistemas *in vivo*. Estas características afectan significativamente a los resultados obtenidos en TFD, realzando la capacidad de predicción de los modelos 3D. Por lo tanto, nuestro modelo 3D reproduce acertadamente uno de los factores más importantes que limitan la eficacia de la TFD en clínica.

Tomados en su conjunto, estos resultados indican que, en un futuro, la investigación de TFD debería centrarse en el uso de esta tercera dimensión, garantizándose de este modo, un diseño más a medida en función del tejido neoplásico a tratar, así como por una mayor aplicabilidad y reproducibilidad. En este sentido, los modelos 3D parecen ser una herramienta fundamental en los

procesos de selección de todos los nuevos fotosensibilizadores conjugados con moléculas dirigidas específicamente hacia las células neoplásicas, para predecir con mayor fiabilidad el resultado de la terapia ensayada.

Este nuevo enfoque metodológico ayudará a mejorar la eficacia de los futuros tratamientos de TFD (o de otras terapias antitumorales), ya que los modelos 3D permiten cerrar la brecha entre los modelos animales, que consumen muchos recursos, y los cultivos en monocapa tradicionales, que carecen de importantes señales determinantes del crecimiento tumoral y la respuesta al tratamiento. Nuestros resultados indican que, los cultivos en monocapa tradicionales sobreestiman significativamente la sensibilidad de las células tumorales a los diversos tratamientos, lo que limita su valor como herramientas para evaluar la eficacia terapéutica. Hay un resultado que apoya esta propuesta: la reducción de la viabilidad de las mismas células tumorales cultivadas en cultivos 3D fue comparable a los resultados observados en los estudios *in vivo*.^{188,190}

Teniendo en cuenta todos los resultados presentados en la presente Tesis Doctoral, es evidente que, el avance de la TFD para convertirse en una verdadera alternativa terapéutica clínica implica el abordaje de un incremento de su eficacia por múltiples vías que permitan su optimización.

En este sentido, parece que el futuro de la TFD precisa de múltiples estudios que permitan: i) diseñar el FS, o la combinación de FSs, que ejerzan un mayor efecto fototóxico, ii) seleccionar los métodos de transporte más idóneos, posiblemente nanoplateformas funcionalizadas, que permitan una acumulación selectiva en el tejido tumoral, para inducir los mínimos efectos secundarios y, iii) diseñar protocolos experimentales enfocados a una terapia oncológica personalizada (en función de las características genéticas del tumor a tratar), incluyendo su combinación con las terapias oncológicas habituales.

Los resultados presentados en la presente Tesis Doctoral pueden abrir una puerta para que distintos grupos de investigación vayan alcanzando estos objetivos en el menor tiempo posible, permitiendo que la TFD se convierta en una verdadera terapia oncológica innovadora y eficaz.

CONCLUSIONES

*“El que se pierde es el que encuentra las
nuevas sendas”*

Nils Kjaer (1870-1924)



Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, permiten extraer las siguientes conclusiones:

1. El porfírico catiónico de nueva síntesis ($\text{Py}_3\text{MeO-TBPO}$), cumple muchas de las características requeridas para ser considerado un buen fotosensibilizador, induciendo una masiva y eficiente muerte celular en células tumorales en cultivo (HeLa), en relación con otros FSs aprobados en Terapia Fotodinámica clínica.
2. Las nanopartículas mesoporosas de sílice, pueden considerarse un buen sistema para la incorporación de fotosensibilizadores, ya que en nuestras condiciones experimentales han demostrado que incrementan la acción fotodinámica de la porfirina catiónica TMPyP.
3. La acción combinada de la ftalocianina metálica de Zinc (ZnPc) y la porfirina catiónica *meso*-tetra(4-N-metilpiridil)porfina (TMPyP), seguida de irradiación, ha demostrado inducir un efecto claramente sinérgico capaz de inactivar distintas líneas celulares establecidas, utilizando protocolos experimentales notablemente inferiores a los descritos para cualquier fotosensibilizador, hasta el momento.
4. La distinta localización subcelular, aparato de Golgi (ZnPc) y lisosomas (TMPyP), parece ser un parámetro fundamental, en la inducción del efecto sinérgico detectado. Por lo tanto, la administración simultánea de sensibilizadores que dañen distintos orgánulos al fotoactivarse, puede ser una herramienta novedosa para incrementar la eficacia de la Terapia Fotodinámica.
5. Se ha confirmado que la muerte celular por apoptosis puede desencadenarse eficientemente por la activación de fotosensibilizadores, desde orgánulos subcelulares distintos de la mitocondria, como los lisosomas y/o el aparato de Golgi.
6. La acción combinada de dos fotosensibilizadores (en nuestro caso, ZnPc + TMPyP), puede convertirse en una estrategia sumamente eficaz para incrementar la eficacia de la Terapia Fotodinámica, ya que en ratones portadores de tumores, es capaz de incrementar la eficacia terapéutica del tratamiento, en relación con la monoterapia.
7. Los sistemas celulares tridimensionales (3D), han confirmado que son una herramienta fundamental e imprescindible en los estudios de Terapia Fotodinámica, actuando de puente entre los cultivos celulares 2D y los modelos experimentales *in vivo*, lo que permitirá un análisis, más rápido y con menos costes, de cualquier nueva estrategia encaminada a incrementar la eficacia de esta terapia antitumoral.

From the results achieved in this PhD Thesis, the following **conclusions** can be drawn:

1. The newly synthesized cationic porphycene (Py₃MeO-TBPO) is endowed with many of the properties needed to be considered a good PS, inducing a massive and efficient cell death in HeLa cells in comparison to approved PSs for clinical use in PDT.
2. Mesoporous silica nanoparticles can be considered as potential vehicles for delivery of photosensitizers, because under our experimental conditions they increase the photodynamic action of the cationic porphyrin TMPyP.
3. The combined protocol of zinc(II) phthalocyanine (ZnPc) and cationic porphyrin *meso*-tetrakis(4-N-methylpyridyl)porphine (TMPyP), followed by irradiation, induces a synergistic cell photoinactivation on different established cell lines, with minimal PDT doses.
4. The different and specific subcellular localization, Golgi apparatus (ZnPc) and lysosomes (TMPyP), plays a fundamental role in the induction of the synergistic effect. Therefore, simultaneous administration of PSs that damages diverse organelles could be a novel tool to increase efficacy of PDT.
5. It has been confirmed that cell death by apoptosis can be efficiently triggered by the activation of photosensitizers from subcellular organelles other than mitochondria, like lysosomes and/or Golgi apparatus.
6. The combined action of two photosensitizers (in our case, ZnPc + TMPyP), can become a highly useful strategy to increase PDT efficacy, since in tumor-bearing mice is able to enhance therapeutic index of treatment *versus* monotherapy.
7. Three-dimensional cellular systems (3D) have the potential to become a fundamental research tool in PDT studies, providing a bridge between 2D cultures and animal models.

BIBLIOGRAFÍA

*“En verdad no hay en la naturaleza un conocimiento
tan fácil y asequible que no pueda llenar todo el
espacio de una vida”*

Juan Luis Vives (1492-1540)



1. Agostinis, P., Berg, K., Cengel, K. A., Foster, T. H., Girotti, A. W., Gollnick, S. O., *et al.* Photodynamic therapy of cancer: An Update. *CA Cancer J Clin.* **61**: 250–281 (2011).
2. Yoo, J. O. and Ha, K. S. in *Int Rev Cell Mol Biol.* **295**: 139–174 (2012).
3. Allison, R. R. and Moghissi, K. Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* doi:10.1016/j.pdpdt.2013.03.011. (2013)
4. Pampaloni, F., Reynaud, E. and Stelzer, E. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**: 839–845 (2007).
5. Celli, J., Spring, B., Rizvi, I., Evans, C., Samkoe, K., Verma, S., *et al.* Imaging and Photodynamic Therapy: Mechanisms, Monitoring and Optimization. *Chem Rev.* **110**: 2795–2838 (2010).
6. Huang, Y., He, S., Cao, W., Cai, K. and Liang, X.-J. Biomedical nanomaterials for imaging-guided cancer therapy. *Nanoscale* **4**: 6135–6149 (2012).
7. Yuan, A., Wu, J., Tang, X. and Zhao, L. Application of Near-Infrared Dyes for Tumor Imaging, Photothermal, and Photodynamic Therapies. *J Pharm Sci.* **102**: 6–28 (2013).
8. Triesscheijn, M., Baas, P., Schellens, J. H. M. and Stewart, F. a Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist* **11**: 1034–44 (2006).
9. Choudhary, S., Nouri, K. and Elsaie, M. L. Photodynamic therapy in dermatology: a review. *Lasers Med. Sci.* **24**: 971–80 (2009).
10. Babilas, P., Schreml, S., Landthaler, M. and Szeimies, R.-M. Photodynamic therapy in dermatology: state-of-the-art. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **26**: 118–32 (2010).
11. Lee, Y. and Baron, E. Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* **30**: 199–209 (2011).
12. Agosta, E., Lazzeri, S., Orlandi, P., Figus, M., Fioravanti, A., Di Desidero, T., *et al.* Pharmacogenetics of antiangiogenic and antineovascular therapies of age-related macular degeneration. *Pharmacogenomics* **13**: 1037–1053 (2012).
13. Shah, G., Sang, D. and Hughes, M. Verteporfin combination regimens in the treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Retina* **29**: 133–48 (2009).
14. Elizalde, J., Vasquez, L., Iyo, F. and Abengoechea, S. Photodynamic therapy in the management of circumscribed choroidal hemangioma. *Can J Ophthalmol.* **47**: 16–20 (2012).
15. Gursoy, H., Ozcakir-Tomruk, C., Tanalp, J. and Yilmaz, S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Invest* **17**: 1113–1125 (2013).
16. Dai, T., Huang, Y. Y. and Hamblin, M. R. Photodynamic therapy for localized infections-State of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **6**: 170–188 (2009).
17. Kharkwal, G. B., Sharma, S. K., Huang, Y. Y., Dai, T. and Hamblin, M. R. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications. *Lasers Surg Med* **43**: 755–767 (2011).

18. St Denis, T., Dai, T., Izikson, L., Astrakas, C., Anderson, R., Hamblin, M., *et al.* All you need is light: antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease. *Virulence* **2**: 509–520 (2011).
19. Yin, H., Zhang, G., Chen, H., Wang, W., Kong, D. and Li, Y. Preliminary Safety Evaluation of Photodynamic Therapy for Blood Purification: An Animal Study. *Artif Organs*. doi: **10.11**: (2014).
20. Waksman, R., McEwan, P., Moore, T., Pakala, R., Kolodgie, F., Hellinga, D., *et al.* PhotoPoint photodynamic therapy promotes stabilization of atherosclerotic plaques and inhibits plaque progression. *J Am Coll Cardiol*. **52**: 1024–32 (2008).
21. Jori, G., Camerin, M. and Soncin, M. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Basic Principles. In *R. Soc. Chem.* 1–18 (2011).
22. Magaraggia, M., Coppellotti, O., Fabris, C., Guidolin, G. and Jori, G. Inactivation of Microbial Pathogens by Photosensitized Processes: Environmental Applications. In *R. Soc. Chem.* 403–424 (2011).
23. Dolmans, D., Fukumura, D. and Jain, R. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* **3**: 380–387 (2003).
24. Garland, M. J., Cassidy, C. M., Woolfson, D. and Donnelly, R. F. Designing photosensitizers for photodynamic therapy: strategies, challenges and promising developments. *Futur. Med. Chem* **1**: 667–691 (2009).
25. O'Connor, A. E., Gallagher, W. M. and Byrne, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **85**: 1053–74 (2009).
26. Juarranz, Á., Jaén, P., Sanz-Rodríguez, F., Cuevas, J. and González, S. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol.* **10**: 148–154 (2008).
27. Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B.* **39**: 1–18 (1997).
28. Jin, C. S. and Zheng, G. Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery. *Lasers Surg Med.* **43**: 734–748 (2011).
29. Alemany-Ribes, M., García-Díaz, M., Acedo, P., Agut, M., Nonell, S., Sagristá, M., *et al.* Why Not Introducing the Third Dimension in Photodynamic Therapy Research? *J Anal Bioanal Tech.* 1–6 (2013).
30. Lipson, R. and Baldes, E. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch Dermatol.* **82**: 508–516 (1960).
31. Lipson, R., Baldes, E. and Olsen, A. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst.* **26**: 1–11 (1961).
32. Dougherty, T. J., Grindey, G. B., Fiel, R., Weishaupt, K. R. and Boyle, D. G. Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst.* **55**: 115–121 (1975).

33. Dougherty, T. Hematoporphyrin as a photosensitizer of tumors. *Photochem Photobiol.* **38**: 377–379 (1983).
34. Dougherty, T. J., Potter, W. R. and Weishaupt, K. R. The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. *Prog Clin Biol Res.* **170**: 301–314 (1984).
35. Kessel, D. Correlation between subcellular localization and photodynamic efficacy. *J. Porphyrins Phthalocyanines* **8**: 1009–1014 (2004).
36. Muehlmann, L. a., Joanitti, G. a., Silva, J. R., Longo, J. P. F. and Azevedo, R. B. Liposomal photosensitizers: potential platforms for anticancer photodynamic therapy. *Braz J Med Biol Res* **44**: 729–737 (2011).
37. Villanueva, A., Vidania, R., Stockert, J., Cañete, M. and Juarranz, A. in *Handb. Photochem. Photobiol.* **1**: 1–39 (2003).
38. Cristobal, J., Stockert, J. C., Villanueva, A., Rello-Varona, S., Juarranz, A. and Cañete, M. Caspase-2: A possible trigger of apoptosis induced in A-549 tumor cells by ZnPc photodynamic treatment. *Int J Oncol.* **28**: 1057–1063 (2006).
39. Rello-Varona, S., Stockert, J. C., Cañete, M., Acedo, P. and Villanueva, A. Mitotic catastrophe induced in HeLa cells by photodynamic treatment with Zn(II)-phthalocyanine. *Int J Oncol.* **32**: 1189–1196 (2008).
40. Machado, A. H. A., Pacheco Soares, C., da Silva, N. S. and Moraes, K. C. M. Cellular and molecular studies of the initial process of the photodynamic therapy in HEP-2 cells using LED light source and two different photosensitizers. *Cell Biol Int.* **33**: 785–795 (2009).
41. Lau, J. T. F., Lo, P. C., Fong, W. P. and Ng, D. K. P. N. A Zinc(II) Phthalocyanine Conjugated with an Oxaliplatin Derivative for Dual Chemo- and Photodynamic Therapy. *J Med Chem.* **55**: 5446–5454 (2012).
42. Juarranz, A., Espada, J., Stockert, J. C., Villanueva, A., Polo, S., Domínguez, V., *et al.* Photodamage induced by Zinc(II)-phthalocyanine to microtubules, actin, alpha-actinin and keratin of HeLa cells. *Photochem Photobiol.* **73**: 283–289 (2001).
43. Tu, J., Wang, T., Shi, W., Wu, G., Tian, X., Wang, Y., *et al.* Multifunctional ZnPc-loaded mesoporous silica nanoparticles for enhancement of photodynamic therapy efficacy by endolysosomal escape. *Biomaterials* **33**: 7903–14 (2012).
44. Marino, J., García Vior, M. C., Furmento, V. a, Blank, V. C., Awruch, J. and Roguin, L. P. Lysosomal and mitochondrial permeabilization mediates zinc(II) cationic phthalocyanine phototoxicity. *Int J Biochem Cell Biol.* **45**: 2553–2562 (2013).
45. Fabris, C., Soncin, M., Miotto, G., Fantetti, L., Chiti, G., Dei, D., *et al.* Zn(II)-phthalocyanines as phototherapeutic agents for cutaneous diseases. Photosensitization of fibroblasts and keratinocytes. *J Photochem Photobiol B.* **83**: 48–54 (2006).
46. Magaraggia, M., Visonà, A., Furlan, A., Pagnan, A., Miotto, G., Tognon, G., *et al.* Inactivation of vascular smooth muscle cells photosensitized by liposome-delivered Zn(II)-phthalocyanine. *J Photochem Photobiol B.* **82**: 53–8 (2006).

47. Camerin, M., Magaraggia, M., Soncin, M., Jori, G., Moreno, M., Chambrier, I., *et al.* The in vivo efficacy of phthalocyanine-nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma. *Eur. J. Cancer* **46**: 1910–8 (2010).
48. Jiang, Z., Shao, J., Yang, T., Wang, J. and Jia, L. Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy. *J Pharm Biomed Anal.* **87**: 98–104 (2014).
49. Juarranz, A., Villanueva, A., Díaz, V. and Cañete, M. Photodynamic effects of the cationic porphyrin, mesotetra(4N-methylpyridyl)porphine, on microtubules of HeLa cells. *J Photochem Photobiol B* **27**: 47–53 (1995).
50. Wu, L., Yang, L., Huang, J., Zhang, L., Weng, X., Zhang, X., *et al.* Cationic Ester Porphyrins Cause High Levels of Phototoxicity in Tumor Cells and Induction of Apoptosis in HeLa Cells. *Chem Biodivers.* **6**: 1066–1076 (2009).
51. Abdelghany, S. M., Schmid, D., Deacon, J., Jaworski, J., Fay, F., McLaughlin, K. M., *et al.* Enhanced antitumor activity of the photosensitizer meso-Tetra(N-methyl-4-pyridyl) porphine tetra tosylate through encapsulation in antibody-targeted chitosan/alginate nanoparticles. *Biomacromolecules.* **14**: 302–310 (2013).
52. Serra, V. V., Zamarrón, A., Faustino, M. a F., Cruz, M. C. I. La, Blázquez, A., Rodrigues, J. M. M., *et al.* New porphyrin amino acid conjugates: synthesis and photodynamic effect in human epithelial cells. *Bioorg Med Chem* **18**: 6170–8 (2010).
53. Allison, R. R. and Sibata, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **7**: 61–75 (2010).
54. Bhuvaneswari, R., Gan, Y. Y., Soo, K. C. and Olivo, M. Targeting EGFR with photodynamic therapy in combination with Erbitux enhances in vivo bladder tumor response. *Mol Cancer.* **8**: 94 (2009).
55. Hanahan, D. and Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646–674 (2011).
56. Garg, A. D., Nowis, D., Golab, J. and Agostinis, P. Photodynamic therapy: illuminating the road from cell death towards anti-tumour immunity. *Apoptosis* **15**: 1050–71 (2010).
57. Brackett, C. and Gollnick, S. Photodynamic therapy enhancement of anti-tumor immunity. *Photochem Photobiol Sci.* **10**: 649–652 (2011).
58. Milla Sanabria, L., Rodríguez, M. E., Cogno, I. S., Rumie Vittar, N. B., Pansa, M. F., Lamberti, M. J., *et al.* Direct and indirect photodynamic therapy effects on the cellular and molecular components of the tumor microenvironment. *Biochim. Biophys. Acta* **1835**: 36–45 (2013).
59. Dudek, A. M., Garg, A. D., Krysko, D. V., De Ruysscher, D. and Agostinis, P. Inducers of immunogenic cancer cell death. *Cytokine Growth Factor Rev.* **24**: 319–33 (2013).
60. Galluzzi, L., Maiuri, M. C., Vitale, I., Zischka, H., Castedo, M., Zitvogel, L., *et al.* Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* **14**: 1237–1243 (2007).

61. Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J. M., Alnemri, E. S., Baehrecke, E. H., Blagosklonny, M. V., *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* **19**: 107–120 (2012).
62. Rello, S., Stockert, J. C., Moreno, V., Gámez, A., Pacheco, M., Juarranz, A., *et al.* Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis* **10**: 201–208 (2005).
63. Wlodkowic, D., Telford, W., Skommer, J. and Darzynkiewicz, Z. Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. *Methods Cell Biol.* **103**: 55–98 (2011).
64. Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., *et al.* Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* **12**: 1463–1467 (2005).
65. Kerr, J., Wyllie, A. and Currie, A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* **26**: 239–257 (1972).
66. Mroz, P., Yaroslavsky, A., Kharkwal, G. B. and Hamblin, M. R. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers (Basel).* **3**: 2516–2539 (2011).
67. Martin, S., Reutelingsperger, C., McGahon, A., Rader, J., van Schie, R., LaFace, D., *et al.* Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* **182**: 1545–1556 (1995).
68. Pereira, W. and Amarante-Mendes, G. Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal? *Scand J Immunol.* **73**: 401–417 (2011).
69. Sakamaki, K. and Satou, Y. Caspases: evolutionary aspects of their functions in vertebrates. *J Fish Biol.* **74**: 727–753 (2009).
70. Ulukaya, E., Acilan, C. and Yilmaz, Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology? *Cell Biochem Funct.* **29**: 468–480 (2011).
71. Olsson, M. and Zhivotovsky, B. Caspases and cancer. *Cell Death Differ.* **18**: 1441–9 (2011).
72. Taylor, R., Cullen, S. and Martin, S. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**: 231–241 (2008).
73. Dubrez-Daloz, L., Dupoux, A. and Cartier, J. IAPs: more than just inhibitors of apoptosis proteins. *Cell Cycle.* **7**: 1036–1046 (2008).
74. Chipuk, J. and Green, D. PUMA cooperates with direct activator proteins to promote mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Cell Cycle* **8**: 2692–2696 (2009).
75. Happonen, L., Strasser, A. and Cory, S. BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *J Cell Sci.* **125**: 1081–1087 (2012).
76. Igney, F. and Krammer, P. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* **2**: 277–288 (2002).

77. Chipuk, J., Fisher, J., Dillon, C., Kriwacki, R., Kuwana, T. and Green, D. Mechanism of apoptosis induction by inhibition of the anti-apoptotic BCL-2 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. **105**: 20327–20332 (2008).
78. Chipuk, J., Moldoveanu, T., Llambi, F., Parsons, M. and Green, D. The BCL-2 family reunion. *Mol Cell*. **37**: 299–310 (2010).
79. Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. **87**: 99–163 (2007).
80. Bröker, L., Kruyt, F. and Giaccone, G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res*. **11**: 3155–3162 (2005).
81. Tait, S. and Green, D. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **11**: 621–632 (2010).
82. López-Otín, C. and Hunter, T. The regulatory crosstalk between kinases and proteases in cancer. *Nat Rev Cancer*. **10**: 278–292 (2010).
83. Kim, R., Emi, M. and Tanabe, K. Caspase-dependent and -independent cell death pathways after DNA damage (Review). *Oncol Rep*. **14**: 595–9 (2005).
84. Kroemer, G. and Martin, S. J. Caspase-independent cell death. *Nat. Med*. **11**: 725–30 (2005).
85. Repnik, U. and Turk, B. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion* **10**: 662–669 (2010).
86. Liu, L., Zhang, Z. and Xing, D. Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage. *Free Radic. Biol. Med*. **51**: 53–68 (2011).
87. Repnik, U., Stoka, V., Turk, V. and Turk, B. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death. *Biochim Biophys Acta*. **1824**: 22–33 (2012).
88. Česen, M. H., Pegan, K., Spes, A. and Turk, B. Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp Cell Res*. **318**: 1245–1251 (2012).
89. Castano, A., Mroz, P. and Hamblin, M. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer*. **6**: 535–545 (2006).
90. Galluzzi, L., Vanden Berghe, T., Vanlangenakker, N., Buettner, S., Eisenberg, T., Vandenabeele, P., *et al.* Programmed necrosis from molecules to health and disease. *Int. Rev. Cell Mol. Biol*. **289**: 1–35 (2011).
91. Vanlangenakker, N., Vanden Berghe, T. and Vandenabeele, P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ*. **19**: 75–86 (2012).
92. Vandenabeele, P., Galluzzi, L., Vanden Berghe, T. and Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. **11**: 700–14 (2010).
93. Christofferson, D. and Yuan, J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol*. **22**: 263–268 (2010).

-
94. Cho, Y., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Tathagat Dutta, R., Guildford, M., *et al.* Phosphorylation-Driven Assembly of RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell* **137**: 1112–1123 (2009).
95. He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., *et al.* Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* **137**: 1100–1111 (2009).
96. Zhang, D., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B., Lin, S., *et al.* RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science* (80-.). **325**: 332–336 (2009).
97. Buytaert, E., Dewaele, M. and Agostinis, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1776**: 86–107 (2007).
98. Levine, B. and Kroemer, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**: 27–42 (2008).
99. Denton, D., Nicolson, S. and Kumar, S. Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts. *Cell Death Differ.* **19**: 87–95 (2012).
100. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. and Klionsky, D. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**: 1069–1075 (2008).
101. Yang, Z. and Klionsky, D. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol.* **12**: 814–822 (2010).
102. Soares, A. R. M., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Iglesias-de la Cruz, M. C., Zamarrón, A., Carrasco, E., *et al.* Glycophthalocyanines as photosensitizers for triggering mitotic catastrophe and apoptosis in cancer cells. *Chem Res Toxicol.* **25**: 940–951 (2012).
103. Sakamoto, S. and Kyprianou, N. Targeting anoikis resistance in prostate cancer metastasis. *Mol Asp. Med.* **31**: 205–214 (2010).
104. Kim, Y., Koo, K., Sung, J., Yun, U. and Kim, H. Anoikis resistance: an essential prerequisite for tumor metastasis. *Int J Cell Biol.* doi: **10.11**: (2012).
105. Paoli, P., Giannoni, E. and Chiarugi, P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta.* doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.026. (2013).
106. Villanueva, A. and Jori, G. Pharmacokinetic and tumour-photosensitizing properties of the cationic porphyrin meso-tetra(4N-methylpyridyl)porphine. *Cancer Lett.* **73**: 59–64 (1993).
107. Plaetzer, K., Krammer, B., Berlanda, J., Berr, F. and Kiesslich, T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci.* **24**: 259–268 (2009).
108. Castano, A. P., Demidova, T. N. and Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two—cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* **2**: 1–23 (2005).
109. Kessel, D., Vicente, M. and Reiners, J. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Autophagy* **2**: 289–290 (2006).

110. Sasnauskiene, A., Kadziauskas, J., Vezelyte, N., Jonusiene, V. and Kirveliėne, V. Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis* **14**: 276–286 (2009).
111. Sasnauskiene, A., Kadziauskas, J., Vezelyte, N., Jonusiene, V. and Kirveliėne, V. Damage targeted to the mitochondrial interior induces autophagy, cell cycle arrest and, only at high doses, apoptosis. *Autophagy* **5**: 743–744 (2009).
112. Appelqvist, H., Waster, P., Kagedal, K. and Ollinger, K. The lysosome: from waste bag to potential therapeutic target. *J Mol Cell Biol.* **5**: 214–226 (2013).
113. Acedo, P., Stockert, J., Cañete, M. and Villanueva, A. Two combined photosensitizers: a goal for more effective Photodynamic Therapy of cancer. *Cell Death Dis.* doi: (2014).
114. Kessel, D., Castelli, M. and Reiners, J. J. Ruthenium red-mediated suppression of Bcl-2 loss and Ca(2+) release initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum: scavenging of reactive oxygen species. *Cell Death Differ.* **12**: 502–511 (2005).
115. Fabris, C., Valduga, G., Miotto, G., Borsetto, L., Jori, G., Garbisa, S., *et al.* Photosensitization with Zinc (II) Phthalocyanine as a Switch in the Decision between Apoptosis and Necrosis Photosensitization with Zinc (II) Phthalocyanine as a Switch in the Decision between Apoptosis and Necrosis 1. 7495–7500 (2001).
116. Villanueva, A., Stockert, J. C., Cañete, M. and Acedo, P. A new protocol in photodynamic therapy: enhanced tumour cell death by combining two different photosensitizers. *Photochem Photobiol Sci.* **9**: 295–297 (2010).
117. Casas, A., Sanz-Rodríguez, F., Di Venosa, G., Rodríguez, L., Mamone, L., Blazquez, A., *et al.* Disorganisation of cytoskeleton in cells resistant to photodynamic treatment with decreased metastatic phenotype. *Cancer Lett.* **270**: 56–65 (2008).
118. Milla Sanabria, L., Cogno, I. S., Rodrıguez, M. E., Sanz-Rodrıguez, F., Zamarron, A., Gilaberte, Y., *et al.* Isolation and characterization of squamous carcinoma cells resistant to photodynamic therapy. *J Cell Biochem.* **112**: 2266–2278 (2011).
119. Di Venosa, G., Rodrıguez, L., Mamone, L., Gandara, L., Rossetti, M. V, Batlle, a, *et al.* Changes in actin and E-cadherin expression induced by 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy in normal and Ras-transfected human mammary cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B.* **106**: 47–52 (2012).
120. Nicotera, P. and Melino, G. Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* **23**: 2757–65 (2004).
121. Ruiz-Gonzalez, R., Acedo, P., Sanchez-Garcia, D., Nonell, S., Cañete, M., Stockert, J. C., *et al.* Efficient induction of apoptosis in HeLa cells by a novel cationic porphycene photosensitizer. *Eur J Med Chem.* **63**: 401–414 (2013).
122. Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L. and Elazar, Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J.* **26**: 1749–1760 (2007).
123. Baguley, B. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol Biotechnol.* **46**: 308–316 (2010).

124. Yin, Q., Shen, J., Zhang, Z., Yu, H. and Li, Y. Reversal of multidrug resistance by stimuli-responsive drug delivery systems for therapy of tumor. *Adv Drug Deliv Rev.* **65**: 1699–1715 (2013).
125. Firczuk, M., Winiarska, M., Szokalska, A., Jodłowska, M., Swiech, M., Bojarczuk, K., *et al.* Approaches to improve photodynamic therapy of cancer. *Front Biosci (Landmark Ed).* **16**: 208–224 (2011).
126. Rizvi, I., Celli, J. P., Evans, C. L., Abu-Yousif, A. O., Muzikansky, A., Pogue, B. W., *et al.* Synergistic enhancement of carboplatin efficacy with photodynamic therapy in a three-dimensional model for micrometastatic ovarian cancer. *Cancer Res.* **70**: 9319–9328 (2010).
127. Khdair, A., Handa, H., Mao, G. and Panyam, J. Nanoparticle-mediated combination chemotherapy and photodynamic therapy overcomes tumor drug resistance in vitro. *Eur J Pharm Biopharm* **71**: 214–222 (2009).
128. Wei, X. Q., Ma, H. Q., Liu, A. H. and Zhang, Y. Z. Synergistic Anticancer Activity of 5-Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy in Combination with Low-dose Cisplatin on Hela Cells. *Asian Pac J Cancer Prev* **14**: 3023–3028 (2013).
129. Nakano, A., Watanabe, D., Akita, Y., Kawamura, T., Tamada, Y. and Matsumoto, Y. Treatment efficiency of combining photodynamic therapy and ionizing radiation for Bowen's disease. *J Eur Acad Dermatol Venereol* **25**: 475–478 (2011).
130. Torres, T., Fernandes, I., Costa, V. and Selores, M. Photodynamic therapy as adjunctive therapy for morpheaform basal cell carcinoma. *Acta Dermatovenereol Alp Panon. Adriat* **20**: 23–25 (2011).
131. Postiglione, I., Chiaviello, A. and Palumbo, G. Enhancing Photodynamic Therapy Efficacy by Combination Therapy: Dated, Current and Oncoming Strategies. *Cancers (Basel)*. **3**: 2597–2629 (2011).
132. Galluzzi, L., Kepp, O. and Kroemer, G. Enlightening the impact of immunogenic cell death in photodynamic cancer therapy. *EMBO J.* **31**: 1055–10577 (2012).
133. Kwitniewski, M., Juzeniene, A., Glosnicka, R. and Moan, J. Immunotherapy: a way to improve the therapeutic outcome of photodynamic therapy? *Photochem Photobiol Sci* **7**: 1011–1017 (2008).
134. Sharma, P., Farrell, T., Patterson, M. S., Singh, G., Wright, J. R., Sur, R., *et al.* In vitro survival of nonsmall cell lung cancer cells following combined treatment with ionizing radiation and photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci* **85**: 99–106 (2009).
135. Compagnin, C., Mognato, M., Celotti, L., Canti, G., Palumbo, G. and Reddi, E. Cell proliferation and cell cycle alterations in oesophageal p53-mutated cancer cells treated with cisplatin in combination with photodynamic therapy. *Cell Prolif.* **43**: 262–274 (2010).
136. He, P., Ahn, J., Shin, J., Hwang, H., Kang, J.-W., Lee, S.-J., *et al.* Enhanced apoptotic effect of combined modality of 9-hydroxypheophorbide alpha-mediated photodynamic therapy and carboplatin on AMC-HN-3 human head and neck cancer cells. *Oncol Rep.* **21**: 329–334 (2009).
137. Hwang, H., Biswas, R., Chung, P.-S. and Ahn, J.-C. Modulation of EGFR and ROS induced cytochrome c release by combination of photodynamic therapy and carboplatin in human

- cultured head and neck cancer cells and tumor xenograft in nude mice. *J Photochem Photobiol B*. **128**: 70–77 (2013).
138. Biswas, R., Chung, P.-S., Moon, J. H., Lee, S.-H. and Ahn, J.-C. Carboplatin synergistically triggers the efficacy of photodynamic therapy via caspase 3-, 8-, and 12-dependent pathways in human anaplastic thyroid cancer cells. *Lasers Med. Sci.* doi:10.1007/s10103-013-1452-9. (2013).
 139. Skyrme, R. J., French, a J., Datta, S. N., Allman, R., Mason, M. D. and Matthews, P. N. A phase-1 study of sequential mitomycin C and 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy in recurrent superficial bladder carcinoma. *BJU Int*. **95**: 1206–1210 (2005).
 140. Peng, C.-L., Lai, P.-S., Lin, F.-H., Yueh-Hsiu Wu, S. and Shieh, M.-J. Dual chemotherapy and photodynamic therapy in an HT-29 human colon cancer xenograft model using SN-38-loaded chlorin-core star block copolymer micelles. *Biomaterials* **30**: 3614–3625 (2009).
 141. Gantchev, T. G., Brasseur, N. and van Lier, J. E. Combination toxicity of etoposide (VP-16) and photosensitisation with a water-soluble aluminium phthalocyanine in K562 human leukaemic cells. *Br J Cancer*. **74**: 1570–1577 (1996).
 142. Crescenzi, E., Chiaviello, A., Canti, G., Reddi, E., Veneziani, B. M. and Palumbo, G. Low doses of cisplatin or gemcitabine plus Photofrin/photodynamic therapy: Disjointed cell cycle phase-related activity accounts for synergistic outcome in metastatic non-small cell lung cancer cells (H1299). *Mol Cancer Ther*. **5**: 776–785 (2006).
 143. Xie, Q., Jia, L., Liu, Y.-H. and Wei, C.-G. Synergetic anticancer effect of combined gemcitabine and photodynamic therapy on pancreatic cancer in vivo. *World J Gastroenterol*. **15**: 737–741 (2009).
 144. Sinha, A., Anand, S., Ortel, B., Chang, Y., Mai, Z., Hasan, T., *et al.* Methotrexate used in combination with aminolaevulinic acid for photodynamic killing of prostate cancer cells. *Br J Cancer*. **95**: 485–495 (2006).
 145. Anand, S., Honari, G., Hasan, T., Elson, P. and Maytin, E. V Low-dose methotrexate enhances aminolevulinate-based photodynamic therapy in skin carcinoma cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. **15**: 3333–3343 (2009).
 146. Zou, W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*. **5**: 263–274 (2005).
 147. Canti, G., Calastretti, A., Bevilacqua, A., Reddi, E., Palumbo, G. and Nicolin, A. Combination of photodynamic therapy+ immunotherapy+ chemotherapy in murine leukemia. *Neoplasma* 184–188. doi:10.4149/neo. (2010).
 148. Castano, A. P., Mroz, P., Wu, M. X. and Hamblin, M. R. Photodynamic therapy plus low-dose cyclophosphamide generates antitumor immunity in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 5495–5500 (2008).
 149. Separovic, D., Bielawski, J., Pierce, J. S., Merchant, S., Tarca, A. L., Bhatti, G., *et al.* Enhanced tumor cures after Foscan photodynamic therapy combined with the ceramide analog LCL29. Evidence from mouse squamous cell carcinomas for sphingolipids as biomarkers of treatment response. *Int J Oncol*. **38**: 521–527 (2011).

150. Ferrario, A., Lim, S., Xu, F., Luna, M., KJ, G., Petasis, N., *et al.* Enhancement of photodynamic therapy by 2,5-dimethyl celecoxib, a non-cyclooxygenase-2 inhibitor analog of celecoxib. *Cancer Lett.* **304**: 33–40 (2011).
151. Kästle, M., Grimm, S., Nagel, R., Breusing, N. and Grune, T. Combination of PDT and inhibitor treatment affects melanoma cells and spares keratinocytes. *Free Radic Biol Med* **50**: 305–312 (2011).
152. Kaiser, P. K. Verteporfin photodynamic therapy and anti-angiogenic drugs: potential for combination therapy in exudative age-related macular degeneration. *Curr Med Res Opin.* **23**: 477–487 (2007).
153. Bai, D., Xia, X., Yow, C. M. N., Chu, E. S. M. and Xu, C. Hypocrellin B-encapsulated nanoparticle-mediated rev-caspase-3 gene transfection and photodynamic therapy on tumor cells. *Eur J Pharmacol* **650**: 496–500 (2011).
154. Makowski, M., Grzela, T. and Niderla, J. Inhibition of Cyclooxygenase-2 Indirectly Potentiates Antitumor Effects of Photodynamic Therapy in Mice. *Clin Cancer Res.* **9**: 5417–5422 (2003).
155. Seshadri, M. and Bellnier, D. The Vascular Disrupting Agent 5,6-Dimethylxanthenone-4-Acetic Acid Improves the Antitumor Efficacy and Shortens Treatment Time Associated with Photochlor-sensitized Photodynamic Therapy In Vivo. *Photochem Photobiol Sci.* **85**: 50–56 (2009).
156. Jiang, F., Cho, K.-K., Mikkelse, T., Tong, L., Lew, Y. S., Hochbaum, N., *et al.* Tamoxifen increases photodynamic therapeutic response of U87 and U251n human glioma cells. *J Neurooncol.* **56**: 51–58 (2002).
157. Gacio, A. F., Fernandez-marcos, C., Swamy, N., Dunn, D. and Ray, R. Photodynamic Cell-Kill Analysis of Breast Tumor Cells With a Tamoxifen-Pyropheophorbide Conjugate. *J Cell Biochem.* **99**: 665–670 (2006).
158. Del Carmen, M. G., Rizvi, I., Chang, Y., Moor, A. C. E., Oliva, E., Sherwood, M., *et al.* Synergism of epidermal growth factor receptor-targeted immunotherapy with photodynamic treatment of ovarian cancer in vivo. *J Natl Cancer Inst.* **97**: 1516–1524 (2005).
159. Szokalska, A., Makowski, M. and Nowis, D. Proteasome inhibition potentiates antitumor effects of photodynamic therapy in mice through induction of endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response. *Cancer Re* **69**: 4235–4243 (2009).
160. Chiaviello, A., Paciello, I., Postiglione, I., Crescenzi, E. and Palumbo, G. Combination of photodynamic therapy with aspirin in human-derived lung adenocarcinoma cells affects proteasome activity and induces apoptosis. *Cell Prolif.* **43**: 480–493 (2010).
161. Ahn, J., Kang, J., Shin, J. and Chung, P. Combination treatment with photodynamic therapy and curcumin induces mitochondria-dependent apoptosis in AMC-HN3 cells. *Int J Oncol.* **41**: 2184–2190 (2012).
162. Schneider-Yin, X., Kurmanaviciene, A., Roth, M., Roos, M., Fedier, A., Minder, E., *et al.* Hypericin and 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX induce enhanced phototoxicity in human endometrial cancer cells with non-coherent white light. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* **6**: 12–18 (2009).

163. Besic Gyenge, E., Lüscher, D., Forny, P., Antoniol, M., Geisberger, G., Walt, H., *et al.* Photodynamic Mechanisms induced by a Combination of Hypericin and a Chlorin Based-Photosensitizer in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Photochem Photobiol.* **89**: 150–162 (2013).
164. Master, A., Livingston, M. and Gupta, A. Sen Photodynamic nanomedicine in the treatment of solid tumors: Perspectives and challenges. *J Control Release.* **168**: 88–102 (2013).
165. Torchilin, V. P. *Passive and Active Drug Targeting: Drug Delivery to Tumors as an Example.* **197**: 3–53 (2010).
166. Fang, J., Nakamura, H. and Maeda, H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. *Adv Drug Deliv Rev.* **63**: 136–151 (2011).
167. Verma, S., Watt, G. M., Mai, Z. and Hasan, T. Strategies for enhanced photodynamic therapy effects. *Photochem Photobiol Sci.* **83**: 996–1005 (2007).
168. Bechet, D., Couleaud, P., Frochot, C., Viriot, M.-L., Guillemin, F. and Barberi-Heyob, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol.* **26**: 612–21 (2008).
169. Ferrario, A. and Gomer, C. Avastin enhances photodynamic therapy treatment of Kaposi's sarcoma in a mouse tumor model. *J Env. Pathol Toxicol Oncol.* **25**: 251–259 (2006).
170. Jiang, F., Zhang, X., Kalkanis, S., Zhang, Z., Yang, H., Katakowski, M., *et al.* Combination therapy with antiangiogenic treatment and photodynamic therapy for the nude mouse bearing U87 glioblastoma. *Photochem Photobiol Sci.* **84**: 128–137 (2008).
171. Ginevra, F., Biffanti, S., Pagnan, A., Biolo, R., Reddi, E. and Jori, G. Delivery of the tumour photosensitizer zinc(II)-phthalocyanine to serum proteins by different liposomes: studies in vitro and in vivo. *Cancer Lett.* **49**: 59–65 (1990).
172. Jori, G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* **36**: 87–93 (1996).
173. Derycke, A. and PA, de W. Liposomes for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* **56**: 17–30 (2004).
174. Paszko, E., Ehrhardt, C., Senge, M. O., Kelleher, D. P. and Reynolds, J. V Nanodrug applications in photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* **8**: 14–29 (2011).
175. Wang, M. and Thanou, M. Targeting nanoparticles to cancer. *Pharmacol Res.* **62**: 90–99 (2010).
176. García-Díaz, M., Nonell, S., Villanueva, A., Stockert, J. C., Cañete, M., Casadó, A., *et al.* Do folate-receptor targeted liposomal photosensitizers enhance photodynamic therapy selectivity? *Biochim. Biophys. Acta* **1808**: 1063–71 (2011).
177. Teng, I. T., Chang, Y. J., Wang, L. S., Lu, H. Y., Wu, L. C., Yang, C. M., *et al.* Phospholipid-functionalized mesoporous silica nanocarriers for selective photodynamic therapy of cancer. *Biomaterials* **34**: 7462–7470 (2013).

178. Master, AM.,Rodriguez, M.E.,Kenney ME, Oleinick NL, Gupta AS. Delivery of the photosensitizer Pc 4 in PEG–PCL micelles for in vitro PDT studies. *J Pharm Sci.* **99**: 2386–2398 (2010).
179. Reshetov, V., Lassalle, H.-P., François, A., Dumas, D., Hupont, S., Gräfe, S., *et al.* Photodynamic therapy with conventional and PEGylated liposomal formulations of mTHPC (temoporfin): comparison of treatment efficacy and distribution characteristics in vivo. *Int J Nanomedicine.* **8**: 3817–31 (2013).
180. Rapozzi, V., Zacchigna, M., Biffi, S., Garrovo, C., Cateni, F., Stebel, M., *et al.* Conjugated PDT drug: Photosensitizing activity and tissue distribution of PEGylated pheophorbide a. *Cancer Biol Ther.* **10**: 471–482 (2010).
181. Thakor, A. and Gambhir, S. Nanooncology: The future of cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin.* **63**: 395–418 (2013).
182. Wu, S.-H., Mou, C.-Y. and Lin, H.-P. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles. *Chem Soc Rev.* **42**: 3862–3875 (2013).
183. Couleaud, P., Morosini, V., Frochot, C., Richeter, S., Raehm, L. and Durand, J. Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications. *Nanoscale* **2**: 1083–1095 (2010).
184. Kong, G., Anyambhatla, G., Petros, W. P., Braun, R. D., Colvin, O. M., Needham, D., *et al.* Efficacy of Liposomes and Hyperthermia in a Human Tumor Xenograft Model: Importance of Triggered Drug Release. *Cancer Res.* **60**: 6950–6957 (2000).
185. Gu, H., Xu, K., Yang, Z., Chang, C. and Xu, B. Synthesis and cellular uptake of porphyrin decorated iron oxide nanoparticles-a potential candidate for bimodal anticancer therapy. *Chem Commun (Camb).* **34**: 4270–4272. (2005).
186. Vaccari, C., Cerize, N., Morais, P., MI, R. and Tedesco, A. Biocompatible magnetic microspheres for Use in PDT and hyperthermia. *J Nanosci Nanotechnol.* **12**: 5111–5116 (2012).
187. Bolfarini, G. C., Siqueira-Moura, M. P., Demets, G. J. F., Morais, P. C. and Tedesco, A. C. In vitro evaluation of combined hyperthermia and photodynamic effects using magnetoliposomes loaded with cucurbit[7]uril zinc phthalocyanine complex on melanoma. *J Photochem Photobiol B.* **115**: 1–4 (2012).
188. Yamada, K. and Cukierman, E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* **130**: 601–610 (2007).
189. Dutta, R. and Dutta, A. Cell-interactive 3D-scaffold; advances and applications. *Biotechnol Adv.* **27**: 334–339 (2009).
190. Griffith, L. and Swartz, M. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **7**: 211–24 (2006).
191. Alemany-Ribes, M., García-Díaz, M., Busom, M., Nonell, S. and Semino, C. E. Toward a 3D Cellular Model for Studying In Vitro the Outcome of Photodynamic Treatments: Accounting for the Effects of Tissue Complexity. *Tissue Eng. Part A* **19**: 1665–74 (2013).

192. Evans, C. L., Abu-Yousif, A. O., Park, Y. J., Klein, O. J., Celli, J. P., Rizvi, I., *et al.* Killing hypoxic cell populations in a 3D tumor model with EtNBS-PDT. *PLoS One* **6**: e23434 (2011).
193. Sutherland, R., McCredie, J. and Inch, W. Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* **46**: 113–120 (1971).
194. Sutherland, R., Sordat, B., Bamat, J., Gabbert, H., Bourrat, B. and Mueller-Klieser, W. Oxygenation and Differentiation in Multicellular Spheroids of Human Colon Carcinoma. *Cancer Res.* **46**: 5320–5329 (1986).
195. Lee, J., Cuddihy, M. and Kotov, N. Three-dimensional cell culture matrices: state of the art. *Tissue Eng Part B Rev.* **14**: 61–86 (2008).
196. Breslin, S. and O'Driscoll, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today.* **18**: 240–249 (2013).
197. Lee, G., Kenny, P., Lee, E. and Bissell, M. Three-dimensional culture models of normal and malignant breast epithelial cells. *Nat Methods.* **2007 4**: 359–365 (2007).
198. Lovett, M., Lee, K., Edwards, A. and Kaplan, D. Vascularization strategies for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* **15**: 353–370 (2009).
199. Celli, J. Stromal interactions as regulators of tumor growth and therapeutic response: A potential target for photodynamic therapy? *Isr J Chem.* **52**: 757–766 (2012).
200. Ragàs, X., Sánchez-García, D., Ruiz-González, R., Dai, T., Agut, M., Hamblin, M., *et al.* Cationic porphycenes as potential photosensitizers for antimicrobial photodynamic therapy. *J Med Chem.* **53**: 7796–7803 (2010).
201. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **65**: 55–63 (1983).
202. Valeriote, F. and Lin, H. Synergistic interaction of anticancer agents: a cellular perspective. *Cancer Chemother Rep.* **59**: 895–900 (1975).
203. Lipsky, N. and Pagano, R. A vital stain for the Golgi apparatus. *Science (80-).* **228**: 745–747 (1985).
204. Raben, N., Shea, L., Hill, V. and Plotz, P. Monitoring autophagy in lysosomal storage disorders. *Methods Enzym.* **453**: 417–449 (2009).
205. Uzdensky, A., Juzeniene, A., Ma, L.-W. and Moan, J. Photodynamic inhibition of enzymatic detachment of human cancer cells from a substratum. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1670**: 1–11 (2004).
206. Stockert, J., Cañete, M., Juarranz, A., Villanueva, A., Horobin, R., Borrell, J., *et al.* Porphycenes: facts and prospects in photodynamic therapy of cancer. *Curr Med Chem.* **14**: 997–1026 (2007).
207. Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C. p53 mutations in human cancers. *Science.* **253**: 49–53 (1991).

208. Buytaert, E., Callewaert, G., Hendrickx, N., Scorrano, L., Hartmann, D., Missiaen, L., *et al.* Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB J.* **20**: 756–758 (2006).
209. Atif, M., Firdous, S., Khurshid, A., Noreen, L., Zaidi, S. S. Z. and Ikram, M. In vitro study of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for apoptosis in human cervical HeLa cell line. *Laser Phys Lett.* **6**: 886–891 (2009).
210. Panzarini, E., Tenuzzo, B. and Dini, L. Photodynamic therapy-induced apoptosis of HeLa cells. *Ann N Y Acad Sci.* **1171**: 617–626. (2009).
211. Berlanda, J., Kiesslich, T., Engelhardt, V., Krammer, B. and Plaetzer, K. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. *J Photochem Photobiol B.* **100**: 173–180 (2010).
212. Cañete, M., Lapeña, M., Juarranz, A., Vendrell, V., Borrell, J., Teixidó, J., *et al.* Uptake of tetraphenylporphycene and its photoeffects on actin and cytokeratin elements of HeLa cells. *Anticancer Drug Des.* **12**: 543–54 (1997).
213. García-Díaz, M., Sánchez-García, D., Soriano, J., Sagristà, M. L., Mora, M., Villanueva, Á., *et al.* Temocene: the porphycene analogue of temoporfin (Foscan®). *Medchemcomm* **2**: 616 (2011).
214. Galluzzi, L., Aaronson, S. a, Abrams, J., Alnemri, E. S., Andrews, D. W., Baehrecke, E. H., *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ.* **16**: 1093–1107 (2009).
215. Ball, D., Mayhew, S., Vernon, D., Griffin, M. and Brown, S. Decreased efficiency of trypsinization of cells following photodynamic therapy: evaluation of a role for tissue transglutaminase. *Photochem Photobiol.* **73**: 47–53 (2001).
216. Uzdensky, A., Kolpakova, E., Juzeniene, A., Juzenas, P. and Moan, J. The effect of sub-lethal ALA-PDT on the cytoskeleton and adhesion of cultured human cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1722**: 43–50 (2005).
217. Tsai, J., Wu, C., Chien, H. and Chen, C. Reorganization of cytoskeleton induced by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy and its correlation with mitochondrial dysfunction. *Lasers Surg Med.* **36**: 398–408 (2005).
218. Hong, X., Jiang, F., Kalkanis, S., Zhang, Z., Zhang, X., Zheng, X., *et al.* Intracellular free calcium mediates glioma cell detachment and cytotoxicity after photodynamic therapy. *Lasers Med Sci.* **24**: 777–786 (2009).
219. Kessel, D., Price, M., Caruso, J. and Jr, J. R. Effects of photodynamic therapy on the endocytic pathway. *Photochem Photobiol Sci.* **10**: 491–498 (2011).
220. Andrzejak, M., Santiago, M. and Kessel, D. Effects of endosomal photodamage on membrane recycling and endocytosis. *Photochem Photobiol.* **87**: 699–706 (2011).
221. Chiu, S., Xue, L., Usuda, J., Azizuddin, K. and Oleinick, N. Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy. *Br J Cancer.* **89**: 1590–1597 (2003).

- 222. Lalier, L., Cartron, P.-F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B., *et al.* Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* **12**: 887–896 (2007).
- 223. Karbowski, M. and Youle, R. J. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ.* **10**: 870–880 (2003).
- 224. Cereghetti, G. and Scorrano, L. The many shapes of mitochondrial death. *Oncogene* **25**: 4717–4724 (2006).
- 225. Wilson, B. and Patterson, M. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol.* **53**: R61–109 (2008).
- 226. Kroemer, G. and Reed, J. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med.* **6**: 513–519 (2000).
- 227. Quiogue, G., Saggi, S., Hung, H., Kenney, M., Oleinick, N., Lemasters, J., *et al.* Signaling From Lysosomes Enhances Mitochondria-Mediated Photodynamic Therapy In Cancer Cells. *Proc Soc Photo Opt Instrum Eng.* **7380**: 1–8 (2009).
- 228. Rodriguez, M., Zhang, P., Azizuddi, K., Delos Santos, G., Chiu, S., Xue, L., *et al.* Structural factors and mechanisms underlying the improved photodynamic cell killing with silicon phthalocyanine photosensitizers directed to lysosomes versus mitochondria. *Photochem Photobiol.* **85**: 1189–1200 (2009).
- 229. Casas, A., Perotti, C., Ortel, B., Di Venosa, G., Saccoliti, M., Batlle, A., *et al.* Tumor cell lines resistant to ALA-mediated photodynamic therapy and possible tools to target surviving cells. *Int J Oncol.* **29**: 397–405 (2006).
- 230. Liu, L., Zhang, Z. and Xing, D. Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage. *Free Radic Biol Med.* **51**: 53–68 (2011).
- 231. Wilson, L., Panda, D. and Jordan, M. Modulation of microtubule dynamics by drugs: a paradigm for the actions of cellular regulators. *Cell Struct Funct.* **24**: 329–35. (1999).
- 232. Jordan, M. and Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer.* **4**: 253–265 (2004).
- 233. Vasioukhin, V. and Fuchs, E. Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr Opin Cell Biol.* **13**: 76–84. (2001).
- 234. Villanueva, A., Cañete, M., Nonell, S., Borrell, J., Teixidó, J. and Juarranz, A. Photodamaging effects of tetraphenylporphycene in a human carcinoma cell line. *Anticancer Drug Des.* **11**: 89–99 (1996).
- 235. Wehrle-Haller, B. Assembly and disassembly of cell matrix adhesions. *Curr Opin Cell Biol.* **24**: 569–81 (2012).
- 236. Re, F., Zanetti, A., Sironi, M., Polentarutti, N., Lanfranccone, L., Dejana, E., *et al.* Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells. *J Cell Biol.* **127**: 537–546 (1994).
- 237. Liu, T., Wu, L. and Berkman, C. Prostate-specific membrane antigen-targeted photodynamic therapy induces rapid cytoskeletal disruption. *Cancer Lett.* **296**: 106–112 (2010).

238. Wu, X., Wu, M. and Zhao, J. X. Recent development of silica nanoparticles as delivery vectors for cancer imaging and therapy. *Nanomedicine*. (2013). doi:10.1016/j.nano.2013.08.008
239. Wang, S., Gao, R., Zhou, F. and Selke, M. Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy. *J Mater Chem*. **14**: 487–493 (2004).
240. Sobczyński, J., Tønnesen, H. and Kristensen, S. Influence of aqueous media properties on aggregation and solubility of four structurally related meso-porphyrin photosensitizers evaluated by spectrophotometric measurements. *Pharmazie*. **68**: 100–119. (2013).
241. Weyergang, A., Kaalhus, O. and Berg, K. Photodynamic therapy with an endocytically located photosensitizer cause a rapid activation of the mitogen-activated protein kinases extracellular signal-regulated kinase, p38, and c-Jun NH2 terminal kinase with opposing effects on cell survival. *Mol. Cancer Ther.* **7**: 1740–50 (2008).
242. Wan, Q., Liu, L., Xing, D. and Chen, Q. Bid is required in NPe6-PDT-induced apoptosis. *Photochem Photobiol.* **84**: 250–257 (2008).
243. Chiu, S. and Oleinick, N. Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy. *Br J Cancer*. **84**: 1099–1106 (2001).
244. Chiu, S., Xue, L., Lam, M., Rodriguez, M., Zhang, P., Kenney, M., *et al.* A requirement for bid for induction of apoptosis by photodynamic therapy with a lysosome- but not a mitochondrion-targeted photosensitizer. *Photochem Photobiol.* **86**: 1161–1173 (2010).
245. Peng, Q., Warloe, T., Moan, J., Godal, A., Apricena, F., Erik, G. K., *et al.* Antitumor effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can be enhanced by the use of a low dose of photofrin in human tumor xenografts. *Cancer Res.* **61**: 5824–5832 (2001).
246. Sasnouski, S., Pic, E., Dumas, D., Zorin, V., D’Hallewin, M., Guillemin, F., *et al.* Influence of incubation time and sensitizer localization on meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC)-induced photoinactivation of cells. *Radiat Res.* **168**: 209–217 (2007).
247. Villanueva, A., Domínguez, V., Polo, S., Vendrell, V., Sanz, C., Cañete, T., *et al.* Photokilling mechanisms induced by zinc(II)-phthalocyanine on cultured tumor cells. *Oncol Res.* **11**: 447–453 (1999).
248. Oleinick, N. L., Morris, R. L. and Belichenko, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**: 1–21 (2002).
249. Ke, M. S., Xue, L., Feyes, D. K., Azizuddin, K., Baron, E. D., McCormick, T. S., *et al.* Apoptosis mechanisms related to the increased sensitivity of Jurkat T-cells vs A431 epidermoid cells to photodynamic therapy with the phthalocyanine Pc 4. *Photochem Photobiol.* **84**: 407–414 (2008).
250. Zamzami, N. and Kroemer, G. Methods to measure membrane potential and permeability transition in the mitochondria during apoptosis. *Methods Mol Biol.* **282**: 103–115 (2004).
251. Park, M.-T., Kang, Y.-H., Park, I.-C., Kim, C.-H., Lee, Y.-S., Chung, H. Y., *et al.* Combination treatment with arsenic trioxide and phytosphingosine enhances apoptotic cell death in arsenic trioxide-resistant cancer cells. *Mol Cancer Ther.* **6**: 82–92 (2007).

252. Patito, I. A., Rothmann, C. and Malik, Z. Original article Nuclear transport of photosensitizers during photosensitization and oxidative stress. **93**: 285–291 (2001).
253. Stockert, J., Villanueva, A., Cristóbal and Cañete, M. Improving images of fluorescent cell labeling by background signal subtraction. *Biotech Histochem.* **84**: 63–78. (2009).
254. Georgiou, G., Ahmet, M., Houlton, A., Silver, J. and Cherry, R. Measurement of the rate of uptake and subcellular localization of porphyrins in cells using fluorescence digital imaging microscopy. *Photochem Photobiol.* **59**: 419–22. (1994).
255. Alvarez, M., Villanueva, A., Acedo, P., Cañete, M. and Stockert, J. C. Cell death causes relocalization of photosensitizing fluorescent probes. *Acta Histochem.* **113**: 363–8 (2011).
256. Kumar, S. Caspase 2 in apoptosis, the DNA damage response and tumour suppression: enigma no more?. *Nat Rev Cancer.* **9**: 897–903. (2009).
257. Mancini, M., Machamer, C. E., Roy, S., Nicholson, D. W., Thornberry, N. a, Casciola-Rosen, L. a, *et al.* Caspase-2 is localized at the Golgi complex and cleaves golgin-160 during apoptosis. *J Cell Biol.* **149**: 603–612 (2000).
258. Van Loo, G., Saelens, X., Matthijssens, F., Schotte, P., Beyaert, R., Declercq, W., *et al.* Caspases are not localized in mitochondria during life or death. *Cell Death Differ.* **9**: 1207–1211 (2002).
259. Kessel, D., Luo, Y., Mathieu, P. and Reiners, J. Determinants of the apoptotic response to lysosomal photodamage. *Photochem Photobiol.* **71**: 196–200 (2000).
260. Stoka, V., Turk, B., Schendel, S. L., Kim, T. H., Cirman, T., Snipas, S. J., *et al.* Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem.* **276**: 3149–3157 (2001).
261. Erdal, H., Berndtsson, M., Castro, J., Brunk, U., Shoshan, M. C. and Linder, S. Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **102**: 192–197 (2005).
262. Boya, P. and Kroemer, G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene* **27**: 6434–51. (2008).
263. Kessel, D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci.* **1**: 837–840. (2002).
264. Uzdensky, A., Kristiansen, B., Moan, J. and Juzeniene, A. Dynamics of signaling, cytoskeleton and cell cycle regulation proteins in glioblastoma cells after sub-lethal photodynamic treatment: antibody microarray study. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**: 795–803 (2012).
265. Golubovskaya, V. M. Focal adhesion kinase as a cancer therapy target. *Anticancer Agents Med Chem.* **10**: 735–741 (2010).
266. Zheng, Y. and Lu, Z. Paradoxical roles of FAK in tumor cell migration and metastasis. *Cell Cycle.* **8**: 3474–3479 (2009).
267. Yang, T. H., Chen, C.-T., Wang, C.-P. and Lou, P.-J. Photodynamic therapy suppresses the migration and invasion of head and neck cancer cells in vitro. *Oral Oncol.* **43**: 358–365 (2007).

268. Mian, M. F., Kang, C., Lee, S., Choi, J. H., Bae, S. S., Kim, S.-H., *et al.* Cleavage of focal adhesion kinase is an early marker and modulator of oxidative stress-induced apoptosis. *Chem Biol Interact.* **171**: 57–66 (2008).
269. Chatzizacharias, N. A., Kouraklis, G. P. and Theocharis, S. E. Disruption of FAK signaling: a side mechanism in cytotoxicity. *Toxicology* **245**: 1–10 (2008).
270. García-Díaz, M., Kawakubo, M., Mroz, P., Sagristà, M. L., Mora, M., Nonell, S., *et al.* Cellular and vascular effects of the photodynamic agent temocene are modulated by the delivery vehicle. *J. Control. Release* **162**: 355–63 (2012).
271. Foster, T., Giesselman, B., Hu, R., Kenney, M. and Mitra, S. Intratumor administration of the photosensitizer pc 4 affords photodynamic therapy efficacy and selectivity at short drug-light intervals. *Transl Oncol.* **3**: 135–141 (2010).
272. Zhou, C., Shunji, C., Jinsheng, D., Junlin, L., Jori, G. and Milanesi, C. Apoptosis of mouse MS-2 fibrosarcoma cells induced by photodynamic therapy with Zn (II)-phthalocyanine. *J Photochem Photobiol B.* **33**: 219–23. (1996).
273. Villanueva, A., Caggiari, L., Jori, G. and Milanesi, C. Morphological aspects of an experimental tumour photosensitized with a meso-substituted cationic porphyrin. *J Photochem Photobiol B.* **23**: 49–56. (1994).
274. Castano, A. P., Demidova, T. N. and Hamblin, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2**: 91–106 (2005).
275. Colombo, L. L., Juarranz, A., Cañete, M., Villanueva, A. and Stockert, J. C. Photodynamic Therapy of the Murine LM3 Tumor Using Meso-Tetra (4-N,N,N-Trimethylanilinium) Porphine. *Int J Biomed Sci.* **3**: 258–262 (2007).
276. Glidden, M. D., Celli, J. P., Massodi, I., Rizvi, I., Pogue, B. W. and Hasan, T. Image-Based Quantification of Benzoporphyrin Derivative Uptake, Localization, and Photobleaching in 3D Tumor Models, for Optimization of PDT Parameters. *Theranostics* **2**: 827–39 (2012).

➤ Publicadas:

- **Acedo P**, Stockert JC, Cañete M, Villanueva A (2014) *Two combined photosensitizers: a goal for more effective Photodynamic Therapy of cancer*. Cell Death & Disease. En prensa. Reference number: CDDIS-13-0870R.
- Ruiz-González R, **Acedo P**, Sánchez-García D, Nonell S, Cañete M, Stockert JC, Villanueva A (2013) *Efficient induction of apoptosis in HeLa cells by a novel cationic porphycene photosensitizer*. European Journal of Medicinal Chemistry 63, 401–414.
- Alemany-Ribes M, García-Díaz M, **Acedo P**, Agut M, Nonell S, Sagristá ML, Mora M, Cañete M, Villanueva A, Stockert JC, Semino CE (2013) *Why Not Introducing the Third Dimension in Photodynamic Therapy Research?*. Journal of Analytical & Bioanalytical Techniques S1, 1-6.
- Villanueva A, Stockert JC, Cañete M, **Acedo P** (2010) *A new protocol in photodynamic therapy: enhanced tumour cell death by combining two different photosensitizers*. Photochemical & Photobiological Sciences 9, 295–297.

➤ Enviadas:

- Gallardo A, Morales J, Comas-Barceló J, Gallavardin T, **Acedo P**, Villanueva A, Nonell S (2014) *Silica-based nanostructured materials for biomedical applications* (capítulo de libro). In Applications of Nanoscience to Photomedicine (M.R. Hamblin, P. Avci, S. Lakshmanan, Eds.).

➤ En redacción:

Actualmente, se encuentran en proceso final de redacción los dos últimos artículos directamente relacionados con la Tesis, donde se recogen los resultados presentados en animales de experimentación y en los modelos de cultivos celulares 3D.

- **Acedo P**, Camerin M, Jori G, Stockert JC, Cañete M, Villanueva A: *Optimizing Photodynamic Therapy: in vitro and in vivo effects of two combined photosensitizers on murine malignant melanoma*.
- **Acedo P**, Alemany-Ribes M, Nonell S, Stockert JC, Cañete M, Semino CE, Villanueva A: *Assessing the therapeutic efficiency of Photodynamic Therapy with two combined photosensitizers on an in vitro 3D tumor model*.

